

CLARISSE BRÜNING SCHMITT ROEPCKE

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA PRODUÇÃO DE
BIOMASSA DE LEVEDURA RICA EM ZINCO ORGÂNICO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Processos Biotecnológicos, Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2007

CLARISSE BRÜNING SCHMITT ROEPCKE

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA PRODUÇÃO DE
BIOMASSA DE LEVEDURA RICA EM ZINCO ORGÂNICO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Processos Biotecnológicos, Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2007

A FABRÍCIO,
meu marido, meu melhor amigo e confidente.
Aos meus pais, MAURÍLIO E ELISABETH,
que me ensinaram a vida, o amor e a amizade.

Dedico

Aos meus avós
BOAVENTURA JOSÉ e MARIA MALVINA,
MARTINHO e JULIETA,
por sempre me mostrarem o bom caminho.
Aos meus irmãos,
BERNARDO, RODRIGO E MAURÍLIO TIAGO,
pela amizade eterna e carinho.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, sem O qual nada seria possível.

Ao professor Carlos Ricardo Soccol, com seu espírito empreendedor e inovador, pela orientação e confiança constante ao longo deste trabalho.

Ao professor José Parada, pelas constantes conversas sobre o trabalho, que me direcionaram para um melhor resultado.

Ao colegiado de professores da pós graduação em Processos Biotecnológicos, pelos conhecimentos transmitidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Aos colegas da pós-graduação Cristine, Bruno, Michele, Maycol, Susan e Rafael, pelo enorme auxílio nos momentos finais do trabalho prático.

A todos os outros colegas da pós-graduação, pela amizade e risadas dadas: Cristina, Daniel, Marlene, Gisele, Celso, Flávera, Luciana, Jeferson, André, Augustus, Andréa, Adriana, Letti, Caroline.

À Mityio, pela ajuda constante no laboratório.

Àquela que se tornou uma grande amiga, Fabiana, pela sua amizade, atenção e valiosas sugestões.

A todos os colegas dos Observatórios Senai/Sesi/IEL, em especial Ariane, Ronivaldo e Marília, pelo estímulo e compreensão.

À Emiliana, do CEPPA, pela ajuda nas análises de determinação de zinco.

A todas as pessoas, que de alguma forma, contribuíram para que esta dissertação se tornasse realidade, o meu agradecimento.

Fantasia

*Clarisse minha neta me informa
que bruxa não existe:*

- A vó disse que é fantasia.

- E fada? - pergunto eu.

- Fada... fada existe.

(Porque é --- fantasia!)

Martinho Brüning

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	3
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 O ZINCO.....	5
2.1.1 Alimentação.....	5
2.1.2 Funções.....	7
2.2 FERMENTAÇÃO.....	8
2.2.1 Fermentação Líquida.....	8
2.2.2 Meios de cultivo.....	8
2.3 AS LEVEDURAS.....	10
2.3.1 Aspectos Biológicos.....	10
2.3.2 Aspectos Metabólicos.....	13
2.3.3 Leveduras para consumo animal e humano.....	14
2.3.4 Gêneros.....	15
2.3.4.1 Gênero <i>Saccharomyces</i>	15
2.3.4.2 Gênero <i>Kluyveromyces</i>	17
2.3.4.3 Gênero <i>Pichia</i>	18
2.4 PRODUÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES DE ZINCO ORGÂNICO.....	19
2.4.1 Legislação.....	19
2.4.2 Produção de <i>Single Cell Protein</i> (SCP).....	20
2.4.3 Metais Orgânicos.....	21
2.4.4 Opções de organismos para a produção de suplementos alimentares de zinco orgânico.....	23
2.4.4.1 Produção de suplementos alimentares de zinco orgânico utilizando a fermentação líquida de leveduras.....	25
2.4.4.1.1 Fatores que influenciam no acúmulo do zinco pelas leveduras.....	29
2.4.4.1.2 A Biomassa de levedura como fonte de zinco orgânico.....	31
2.4.4.1.2.1 Aspectos nutricionais.....	32
2.4.4.1.2.2 Aspectos Industriais.....	34
2.4.4.1.3 Utilização da levedura na alimentação animal.....	35
2.4.4.2 Produção de suplementos alimentares de zinco orgânico utilizando outros processos.....	37
2.4.5 Determinação do Zinco Orgânico.....	39
2.5 PRODUÇÃO DE VITAMINA B ₂	40
2.6 VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS E AGROINDUSTRIAIS.....	42
2.6.1 A Cana-de-Açúcar.....	42
2.6.2 A Soja.....	44
2.7 PLANIFICAÇÃO EXPERIMENTAL.....	45
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1 MICRORGANISMOS.....	47
3.2 MELAÇO DE SOJA E MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	47
3.3 MEIOS DE CULTIVO.....	48
3.3.1 Meio Yeast Medium (YM) Líquido.....	48
3.3.2 Meio YM Sólido.....	48
3.4 MANUTENÇÃO DAS CEPAS.....	48
3.5 PREPARO DO INÓCULO.....	48
3.6 FLUXOGRAMA DO PROCESSO.....	49
3.7 SELEÇÃO DAS CEPAS.....	52
3.8 TESTE DO ACÚMULO DO ZINCO X TEMPO DE CULTIVO.....	53

3.9	TESTE DA ADAPTAÇÃO DA CEPA DE <i>P. guilliermondii</i> Wickerham NRRL Y27063 EM MEIO CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ZINCO	54
3.10	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES QUÍMICAS E FÍSICAS PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM ZINCO ORGÂNICO	56
3.10.1	Fonte de Carbono	56
3.10.2	Fonte de Nitrogênio Orgânico	57
3.10.3	Delineamento Experimental	58
3.10.3.1	Planejamento Fatorial Fracionário 2^{8-4}	58
3.10.3.2	Planejamento Fatorial Completo 3^2	59
3.11	TESTES DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE ZINCO ORGÂNICO ADSORVIDO E ABSORVIDO	60
3.11.1	Rompimento Celular	60
3.11.1.1	Rompimento Celular - Sonicação	61
3.11.1.2	Rompimento Celular - Adição de etanol, NaCl e pré-autolisado	61
3.11.1.3	Rompimento Celular - Adição de álcali e aquecimento	62
3.11.2	Separação do Zinco Orgânico Adsorvido, Zinco Orgânico Absorvido e Zinco Livre ..	62
3.12	CINÉTICA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM ZINCO ORGÂNICO	62
3.13	TESTE DE PRODUÇÃO DE VITAMINA B ₂	64
3.14	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS QUÍMICO-MICROBIOLÓGICAS	65
3.14.1	Químicas	65
3.14.1.1	Determinação do pH	65
3.14.1.2	Determinação de açúcares totais	65
3.14.1.3	Determinação de Zinco	66
3.14.1.4	Determinação da Vitamina B ₂	66
3.14.1.5	Determinação do peso seco de biomassa produzida	67
3.14.2	Microbiológicas	67
3.14.2.1	Contagem celular / Viabilidade celular	67
3.14.2.2	Análise microscópica das células das leveduras	68
3.15	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUBSTRATOS	69
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS MELAÇOS	70
4.1.1	Melaço de Cana-de-Açúcar	70
4.1.2	Melaço de Soja	71
4.2	SELEÇÃO DAS CEPAS	71
4.3	TESTE DO ACÚMULO DO ZINCO X TEMPO DE CULTIVO	79
4.4	TESTE DA ADAPTAÇÃO DA CEPA DE <i>P. guilliermondii</i> Wickerham NRRL Y27063 EM MEIO CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ZINCO	81
4.5	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES QUÍMICAS E FÍSICAS DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM ZINCO ORGÂNICO	88
4.5.1	Fonte de carbono	88
4.5.2	Fonte de nitrogênio orgânico	91
4.5.3	Delineamento experimental	93
4.5.3.1	Planejamento Fatorial Fracionário 2^{8-4}	93
4.5.3.2	Planejamento Fatorial Completo 3^2	98
4.6	TESTES DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE ZINCO ORGÂNICO ADSORVIDO E ABSORVIDO	101
4.6.1	Rompimento Celular	101
4.6.2	Separação do Zinco Orgânico Adsorvido, Zinco Orgânico Absorvido e Zinco Livre ..	102
4.7	CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM ZINCO ORGÂNICO	103
4.8	TESTE PRODUÇÃO DE VITAMINA B ₂	108
5	CONCLUSÕES	110
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	113
	REFERÊNCIAS	114
	APÊNDICE	132

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA E REPRODUÇÃO DE UMA CÉLULA TÍPICA DE LEVEDURA	11
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DA PAREDE CELULAR DE UMA CÉLULA TÍPICA DE LEVEDURA	12
FIGURA 3 – FOTO EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
FIGURA 4 – DIFERENÇA ESTRUTURAL ENTRE UM COMPLEXO ZINCO AMINOÁCIDO E UM QUELATO ZINCO AMINOÁCIDO.....	23
FIGURA 5 – HOMEOSTASE DO ZINCO EM LEVEDURAS.....	26
FIGURA 6 – ESTRUTURA DA VITAMINA B ₂	40
FIGURA 7 – MOLÉCULAS DOS AÇÚCARES GLICOSE, FRUTOSE E SACAROSE	43
FIGURA 8 – MOLÉCULAS DOS AÇÚCARES SACAROSE, RAFINOSE E ESTAQUIOSE	45
FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA ENRIQUECIDA COM ZINCO ORGÂNICO.....	51
FIGURA 10 – CULTIVO EM FRASCOS ERLNMEYER COM AGITAÇÃO EM AGITADOR DO TIPO SHAKER.....	53
FIGURA 11 – FERMENTADOR INCELTECH LH SGI – SET 2M	63
FIGURA 12 – CÂMARA DE NEUBAUER.....	68
FIGURA 13 – ZINCO ACUMULADO PELA BIOMASSA PRODUZIDA, EM RELAÇÃO À QUANTIDADE DE ZnSO ₄ ADICIONADO AO MEIO DE CULTIVO (TEMPO DE CULTIVO DE 120 HORAS).....	74
FIGURA 14 – PORCENTAGEM DE ZnSO ₄ ADICIONADO AO MEIO DE CULTIVO ACUMULADO PELA BIOMASSA PRODUZIDA (TEMPO DE CULTIVO DE 120 HORAS, CONCENTRAÇÃO DE ZnSO ₄ ADICIONADA = 0,5g/L).....	75
FIGURA 15 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA PELA LEVEDURA <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y8281 COM ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ZNSO ₄ AO MEIO DE CULTIVO ...	76
FIGURA 16 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA PELA LEVEDURA <i>Sacharomyces cerevisiae</i> NRRL Y2034 COM ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ZNSO ₄ AO MEIO DE CULTIVO ..	77
FIGURA 17 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA PELA LEVEDURA <i>Sacharomyces cerevisiae</i> NRRL YB 2293 COM ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ZNSO ₄ AO MEIO DE CULTIVO	77
FIGURA 18 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA PELA LEVEDURA <i>Komagataella (Pichia) pastoris</i> NRRL Y 1603 COM ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ZNSO ₄ AO MEIO DE CULTIVO	78
FIGURA 19 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA PELA LEVEDURA <i>Pichia guilliermondii</i> Wickerham NRRL Y 27063 COM ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ZNSO ₄ AO MEIO DE CULTIVO	79
FIGURA 20 – ZINCO ACUMULADO NA BIOMASSA PRODUZIDA EM RELAÇÃO AO TEMPO DE CULTIVO.....	80
FIGURA 21 – PORCENTAGEM DE ZNSO ₄ ADICIONADO AO MEIO DE CULTIVO QUE FOI EFETIVAMENTE ACUMULADO PELA BIOMASSA PRODUZIDA AO LONGO DO TEMPO DE CULTIVO.....	81
FIGURA 22 - NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS/ ML DE MEIO DE CULTIVO NOS TESTES UTILIZANDO A CEPA NÃO ADAPTADA DE <i>Pichia guilliermondii</i> Wickerham NRRL Y 27063.....	83
FIGURA 23 - NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS/ ML DE MEIO DE CULTIVO NOS TESTES UTILIZANDO A CEPA ADAPTADA DE <i>Pichia guilliermondii</i> Wickerham NRRL Y 27063.....	83
FIGURA 24 – VISUALIZAÇÃO EM MICROSCÓPIO ÓPTICO DE CÉLULAS NÃO ADAPTADAS DE <i>Pichia guilliermondii</i> Wickerham NRRL Y 27063 AO ZINCO, APÓS 120 HORAS, COM ADIÇÃO DE 1,0 g/L DE ZnSO ₄ AO MEIO DE CULTIVO (EXAME A FRESCO – AUMENTO DE 100X).....	84
FIGURA 25 – VISUALIZAÇÃO EM MICROSCÓPIO ÓPTICO DE CÉLULAS ADAPTADAS DE <i>Pichia guilliermondii</i> Wickerham NRRL Y 27063 AO ZINCO, APÓS 120 HORAS, COM ADIÇÃO DE 1,0 g/L DE ZnSO ₄ AO MEIO DE CULTIVO (EXAME A FRESCO – AUMENTO DE 100X).....	85
FIGURA 26 – QUANTIDADE DE ZnSO ₄ ADICIONADA AO MEIO DE CULTIVO VERSUS A QUANTIDADE ACUMULADA DE ZINCO PELAS CEPAS NÃO ADAPTADAS E ADAPTADA DE <i>Pichia guilliermondii</i> Wickerham NRRL Y 27063	86
FIGURA 27 – QUANTIDADE DE ZnSO ₄ ADICIONADA AO MEIO DE CULTIVO VERSUS O PESO SECO OBTIDO DE BIOMASSA DAS CEPAS NÃO ADAPTADA E ADAPTADA DE <i>Pichia guilliermondii</i> Wickerham NRRL Y 27063.....	87
FIGURA 28 – QUANTIDADE DE ZINCO TOTAL ACUMULADA PELA BIOMASSA PRODUZIDA VERSUS °BRIX DAS FONTES DE CARBONO ADICIONADAS	89

FIGURA 29 – PESO SECO DA BIOMASSA PRODUZIDA VERSUS °BRIX DAS FONTES DE CARBONO ADICIONADAS	90
FIGURA 30 – QUANTIDADE DE ZINCO ACUMULADA PELA BIOMASSA PRODUZIDA VERSUS A FONTE DE NITROGÊNIO ORGÂNICO ADICIONADA.....	92
FIGURA 31 - PESO SECO DA BIOMASSA PRODUZIDA VERSUS FONTE DE NITROGÊNIO ORGÂNICO ADICIONADA.....	92
FIGURA 32 – GRÁFICO DIAGRAMA DE PARETO: INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE ZINCO ACUMULADO.....	97
FIGURA 33 – GRÁFICO SUPERFÍCIE DE RESPOSTA: INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES CONCENTRAÇÃO DE $ZnSO_4$ E CONCENTRAÇÃO DE $Fe_2(SO_4)_3$ SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE ZINCO ACUMULADO.....	98
FIGURA 34 – GRÁFICO DIAGRAMA DE PARETO: INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE ZINCO ACUMULADO.....	100
FIGURA 35 – GRÁFICO CONTORNO: INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES CONCENTRAÇÃO DE $ZnSO_4$ E CONCENTRAÇÃO DE $Fe_2(SO_4)_3$ SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE ZINCO TOTAL ACUMULADO.....	101
FIGURA 36 – CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ZINCO ORGÂNICO TOTAL PELA CEPA <i>P. guilliermondii</i> Wickerham NRRL Y27063.....	104
FIGURA 37 – CONCENTRAÇÃO DE ZINCO ORGÂNICO TOTAL EM RELAÇÃO AO VOLUME DE FERMENTADO PRODUZIDO EM FERMENTADOR.....	106
FIGURA 38 – PORCENTAGEM DAS VARIEDADES DE ZINCO PRESENTES NA BIOMASSA PRODUZIDA NA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM ZINCO ORGÂNICO	107
FIGURA 39 – PESO SECO DA BIOMASSA PRODUZIDA AO LONGO DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM ZINCO ORGÂNICO	108

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – VALORES DIÁRIOS DE ZINCO RECOMENDADOS.....	6
TABELA 2 – MICRORGANISMOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE SCP, DE ACORDO COM A FONTE DE CARBONO UTILIZADA.....	15
TABELA 3 – DEFINIÇÕES DOS PRODUTOS DE MINERAIS ORGÂNICOS DE ACORDO COM A ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE AUTORIDADES NO CONTROLE DE ALIMENTOS PARA ANIMAIS.....	22
TABELA 4 - ACÚMULO DE ZINCO PELA BIOMASSA DE VÁRIOS ORGANISMOS CITADOS PELA LITERATURA.....	24
TABELA 5 – COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS DA CÉLULA ÍNTEGRA DE LEVEDURA DE CERVEJA, COMPARADO AO ISOLADO PROTÉICO DE SOJA E PADRÃO DE REFERÊNCIA DA FAO/WHO/ONU.....	33
TABELA 6 – VALORES (REAIS E CODIFICADOS) DAS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2^{8-4}	59
TABELA 7 – VALORES (REAIS E CODIFICADOS) DAS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 3^2	60
TABELA 8 – MÉTODOS UTILIZADOS NA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUBSTRATOS DAS FERMENTAÇÕES.....	69
TABELA 9 - COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	70
TABELA 10 - COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MELAÇO DE SOJA.....	71
TABELA 11 – RESULTADOS DE PESO SECO E ZINCO ACUMULADO PELAS CINCO CEPAS ESTUDADAS (TEMPO = 120 HORAS).....	73
TABELA 12 – PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2^{8-4} PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM ZINCO ORGÂNICO.....	95
TABELA 13 – PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 3^2 PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM ZINCO ORGÂNICO.....	99
TABELA 14 – QUANTIDADES DAS DIFERENTES VARIEDADES DE ZINCO PRESENTES NA BIOMASSA DE LEVEDURA RICA EM ZINCO ORGÂNICO AVALIADA.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAFCO	<i>Association of American Feed Control Officials</i>
AOAC	<i>Association of Official Agricultural Chemists</i>
Brix	Escala Brix (gramas de sólidos solúveis por 100 ml de solução)
C/N	Carbono/Nitrogênio
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	<i>Generally Regarded as Safe</i>
IDR	Ingestão Diária Recomendada
NRRL	<i>Agricultural Research Service Culture Collection</i>
ONU	Organização das Nações Unidas
rpm	Rotações por minuto
SCP	<i>Single Cell Protein</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
YM	<i>Yeast Medium</i>

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um bioprocesso para a produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico, como alternativa de suplemento proteico para alimentação animal. Cinco cepas de leveduras foram testadas quanto à sua capacidade de acúmulo de zinco no seguinte meio de cultivo: Melaço de cana-de-açúcar, 5°Brix; Extrato de Levedura, 10 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L; KH_2PO_4 , 5 g/L; MgSO_4 , 0,5 g/L. As concentrações de ZnSO_4 testadas foram 0,05, 0,1, 0,2 e 0,5 g/L. As condições de cultivo foram: temperatura, 30 °C; pH inicial, 6,0; agitação, 120 rpm; tempo de cultivo de 120 horas. Os experimentos foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL, com volume de meio de 100 mL, agitados por agitador do tipo *Shaker*. A cepa que apresentou maior capacidade de acúmulo foi a *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063, que na concentração de 0,5 g/L de ZnSO_4 , apresentou o teor de zinco acumulado de 6.820 mg/kg de peso seco de biomassa. Testes foram realizados para verificar o tempo necessário de cultivo para produção de biomassa enriquecida com zinco, na concentração de 0,5 g/L de ZnSO_4 . Os tempos avaliados foram 24, 48, 72, 96 e 120 horas. A *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 obteve o melhor acúmulo de zinco no tempo 120 horas, que foi de 7.997 mg/kg. Foi testada uma adaptação prévia da *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 a concentrações crescentes do metal no meio, em cultivos com concentrações de ZnSO_4 de 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 1,0 g/L. Os testes realizados com células da levedura não adaptadas obtiveram um maior acúmulo de zinco, que foi de 10.848 mg/kg, com adição de 1,0 g/L de ZnSO_4 ao meio. Dois diferentes resíduos foram testados como fonte de carbono: o melaço de cana-de-açúcar e o melaço de soja, nas concentrações de 5, 10 e 15 ° Brix. Os melhores resultados obtidos foram nos testes utilizando o melaço de soja a 5° Brix e o melaço de cana-de-açúcar a 5° Brix, com acúmulo de 17.956 e 13.028 mg/kg, respectivamente. Três fontes de nitrogênio orgânico foram avaliadas: o extrato de levedura (10,0 g/L), a peptona caseinada (8,0 g/L), e o caldo de triptona de soja (8,0 g/L). A melhor fonte de nitrogênio orgânico para a retenção do zinco na biomassa foi o extrato de levedura, que em presença de 5° Brix de melaço de soja, gerou uma biomassa com 10.128 mg de zinco/kg. Foram testadas oito variáveis em um Planejamento Fatorial Fracionário 2^{8-4} : concentrações de ZnSO_4 , de MgSO_4 , de KH_2PO_4 , de Extrato de Levedura, de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, °Brix ; tempo de adição; e pH. A maior concentração de zinco acumulado encontrada foi de 24.982 mg/kg, e os fatores que geraram maior efeito positivo significativo no acúmulo de zinco foram as concentrações de ZnSO_4 e de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, de 2,5 g/L e 0,1 g/L, respectivamente. Estas duas variáveis significativas foram avaliadas em um Planejamento Fatorial Completo 3^2 . A maior concentração de zinco acumulado obtida foi de 75.090 mg/kg, e a variável significativa identificada foi a concentração de ZnSO_4 , de 10,0 g/L. Foi avaliada a cinética de produção de biomassa rica em zinco orgânico em um fermentador de 2 L. O experimento demonstrou que a maior concentração de zinco orgânico total na biomassa ocorreu no tempo 144 horas, onde a concentração foi de 96.030 mg/kg. O aumento na concentração do metal na biomassa pode ser justificado pela realização do processo em fermentador, o que proporcionou melhoras na aeração e na agitação. Foram realizados testes para verificar a possibilidade de produção de vitamina B₂ pela *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063. Esta cepa produziu concentrações desta vitamina muito baixas, que foram de 1,3 µg/mL em ausência de luz, e 1,0 µg/mL na presença de luz.

Palavras-chave: Levedura, Zinco orgânico, *Pichia*, fermentação líquida.

ABSTRACT

The objective of this work was to develop a bioprocess for the production of an yeast biomass rich in organic zinc. Five strains had their zinc accumulation capacity evaluated in the following medium: sugarcane molasses, 5°Brix; yeast extract, 10 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L; KH_2PO_4 , 5 g/L; MgSO_4 , 0,5 g/L. The tested concentrations of ZnSO_4 were 0,05, 0,1, 0,2 and 0,5 g/L. The cultivation conditions were: temperature, 30 °C; initial pH, 6,0; agitation, 120 rpm; total cultivation time, 120 hours. The essays were performed in 250 mL Erlenmeyer flasks a 100 mL medium volume. The strain that presented the highest accumulation capacity was *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063, in the ZnSO_4 concentration of 0,5 g/L, with an accumulated zinc concentration of 6.820 mg/kg per biomass dry weight. Tests were done to evaluate the cultivation time necessary for the production of the zinc enriched biomass, in the ZnSO_4 concentration of 0,5 g/L. The evaluated times were 24, 48, 72, 96 and 120 hours. The *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 had its best zinc accumulation in 120 hours, which was of 7.997 mg/kg. It was tested a previous adaptation of *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 under increasing metal concentrations in the medium, in cultivations with ZnSO_4 concentrations of 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 and 1,0 g/L. The essays with the yeast cells that suffered no adaptation obtained the best zinc accumulation, which was of 10.848 mg/kg, with the addition of 1,0 g/L of ZnSO_4 to the medium. Two different residues were tested as a carbon source: the sugarcane molasses and the soybean molasses, in the 5, 10 and 15 ° Brix concentrations. The best results were obtained in the tests using the 5° Brix soybean molasses, and the 5° Brix sugarcane molasses, with the accumulation of 17.956 and 13.028 mg/kg, respectively. Three nitrogen sources were evaluated: yeast extract (10,0 g/L), casein peptone (8,0 g/L), and soy triptone broth (8,0 g/L). The best organic nitrogen source for the zinc retention in the biomass was the yeast extract, which in the presence of 5° Brix of soybean molasses produced a biomass with 10.128 mg of zinc/kg. Eight variables were tested on a Fractional Factorial Design 2^{8-4} : concentrations of ZnSO_4 , of MgSO_4 , of KH_2PO_4 , of yeast extract, of $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, °Brix; addition time; and pH. The highest concentration of accumulated zinc found was of 24.982 mg/kg, and the factors that created a significant positive effect over the zinc accumulation were the concentrations of ZnSO_4 and of $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, of 2,5 g/L and 0,1 g/L, respectively. These two significant variables were evaluated on a Complete Factorial Design 3^2 . The highest concentration of accumulated zinc obtained was of 75.090 mg/kg, and the identified significant variable was the concentration of ZnSO_4 concentration, of 10,0 g/L. Cultivation kinetics was accomplished in a 2 L fermenter. The essay revealed that the highest concentration of total organic zinc occurred in 144 hours, which was of 96.030 mg/kg. The increase of the metal concentration in the biomass can be explained by the realization of this procedure in a fermenter, which provides improvements in the aeration and agitation. Tests were done to verify the possibility of vitamin B₂ production by *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063. This strain produced very low concentrations of this vitamin, which was of 1,3 µg/ mL in the absence of light, and 1,0 µg/ mL in the presence of light.

Keywords: Yeast, Organic zinc, *Pichia*, liquid fermentation.

1 INTRODUÇÃO

Os freqüentes aumentos nos preços de grãos de cereais e suplementos protéicos vegetais, utilizados na alimentação de animais, têm despertado um grande interesse pelo aproveitamento de alimentos conhecidos como “não convencionais” na indústria animal do Brasil. Dentre os produtos que podem substituir os suplementos protéicos convencionais na alimentação animal, destacam-se os microrganismos (algas, bactérias, fungos e leveduras), considerados fonte de proteína unicelular. O interesse na utilização desses microrganismos na alimentação animal deve-se, entre outros motivos, à sua alta velocidade de crescimento, à possibilidade de cultivo em substratos diversos e de baixo custo, e ao seu elevado teor protéico.

O uso de suplementos nutricionais tem se tornado cada vez mais comum e está crescendo num ritmo bastante acelerado, devido a algumas vantagens de aplicação, tais como baixo custo, eficácia e potencial de regeneração. Além disso, estes suplementos estão regulamentados por uma menor quantidade de leis, que por sua vez são menos rígidas do que as leis que tratam dos medicamentos prescritos (SHOEIB e MESTER, 2007).

Os suplementos minerais, em particular, são freqüentemente aplicados com o intuito de garantir a quantidade necessária de minerais traço - endógenos e essenciais - que possam estar em deficiência na dieta. Estes elementos traço, geralmente espécies metálicas e semi-metálicas, são naturalmente encontradas em organismos vivos como uma consequência da evolução bioquímica e da bioindução de ligantes que fazem interações com os metais (TEMPLETON et al., 2000).

Normalmente duas formas de suplementos minerais estão comercialmente disponíveis: os sais inorgânicos e as espécies metálicas ligadas a substratos orgânicos. Estes últimos têm o metal ligado a uma molécula como uma vitamina ou um aminoácido. Esta ligação é referenciada em literatura como o motivo de um aumento na eficiência da absorção do metal pelo organismo. Também foi sugerido que os metais ligados organicamente possuem maior atividade biológica e são geralmente menos tóxicos em concentrações maiores, quando comparados com seus respectivos sais inorgânicos (VINSON e HSIAO, 1985; DEMIRCI e POMETTO, 2000).

Tido como um micronutriente essencial, o zinco possui papel importante em diversos processos biológicos dos organismos. É o segundo micromineral com maior distribuição no corpo humano. Entre as suas funções estão a síntese protéica; o metabolismo do DNA e do RNA; o metabolismo energético, de carboidratos e de lipídios; além de sua destacada atuação na manutenção da imunocompetência do indivíduo (DUTRA-DE-OLIVEIRA e MARCHINI, 1998; GAUDREAU et al., 2001).

Devido a sua habilidade em incorporar metais em suas células, a biomassa de leveduras está sendo intensamente utilizada como um veículo de entrega em uma série de suplementos minerais, sendo uma fonte rica em proteínas. A biodisponibilidade, a atividade desejada e a toxidez destes suplementos dependem da concentração do metal, seu estado de oxidação e as formas químicas de seus complexos (TEMPLETON et al., 2000; CORNELIS et al., 2001).

As leveduras possuem várias propriedades que podem levar a um aumento da resistência das mesmas aos metais tóxicos. Dois mecanismos importantes para o aumento desta resistência podem ser: a redução do consumo ou impermeabilidade ao metal, e o seqüestro de metais dentro e/ou ao redor da célula. O enriquecimento de metais em leveduras é obtido através da inclusão de um sal inorgânico do metal desejado em um meio de cultivo, seguido por um tratamento térmico para cessar o crescimento da levedura e inibir a atividade enzimática. Estudos relatam que a introdução de sais inorgânicos do metal de interesse, solúveis em água como um componente do meio de cultivo, para a produção de leveduras através de uma fermentação, resulta na incorporação de uma quantidade substancial do metal absorvido pela levedura (SUHAJDA et al., 2000).

O metal pode ser incorporado à levedura através de uma série de mecanismos, que incluem a produção de proteínas ligadas a metais (incluindo as metalotioneínas), mineralização e seqüestro pelos vacúolos (WELCH et al., 1993; ECKER et al., 1986).

Um expressivo número de processos fermentativos industriais aproveita o potencial de matérias-primas renováveis na obtenção de produtos químicos, combustíveis, alimentos e bebidas, bioinseticidas, fármacos e enzimas, entre outros. Entre as matérias-primas utilizadas, os resíduos agrícolas e agroindustriais desempenham um papel marcante, com uma gama de processos fermentativos sendo realizados com base em materiais como caldo e melaço de cana-de-açúcar,

farelos de soja, trigo e arroz, resíduos celulósicos e da indústria de papel (SERAFINI et al., 2002).

A produção de biomassa de leveduras rica em zinco orgânico tem grande importância para a indústria animal. Isto se deve principalmente ao fato de o produto obtido neste processo desempenhar papel essencial no organismo dos animais, atuando nas funções de responsabilidade do zinco, além de proporcionar uma potencialização da absorção do zinco pelo organismo animal.

1.1 OBJETIVO PRINCIPAL

- Desenvolver um bioprocesso para a produção de biomassa de levedura com alto teor de zinco orgânico, como alternativa de suplemento protéico para alimentação animal.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar, entre cinco cepas de leveduras, aquela que apresenta o melhor acúmulo de zinco total na produção de biomassa enriquecida com este metal;
- Determinar o tempo de cultivo celular necessário para o maior acúmulo de zinco pela cepa de levedura selecionada;
- Verificar se a técnica de adaptação aplicada à cepa de levedura selecionada, em um meio rico em zinco, aumenta o acúmulo do metal pela biomassa;
- Selecionar a melhor fonte de carbono, utilizando resíduos industriais, para a cepa de levedura selecionada;
- Determinar a melhor fonte de nitrogênio orgânico para a cepa de levedura selecionada;
- Otimizar o processo de cultivo celular de biomassa rica em zinco em *Shaker*;

- Estudar a cinética da produção de biomassa rica em zinco orgânico em fermentador;
- Determinar uma metodologia para o rompimento celular da cepa de levedura selecionada;
- Estabelecer uma metodologia para a quantificação das variedades de zinco presentes na biomassa de levedura;
- Estudar a possibilidade de produção da vitamina B₂ pela cepa de levedura selecionada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O ZINCO

O zinco é um micronutriente essencial, e desempenha funções cruciais em diversos processos biológicos dos organismos. Depois do ferro, é o micromineral com distribuição mais abundante no corpo humano. No sistema nervoso central, apenas sódio, potássio e magnésio são encontrados em concentrações mais altas.

Entre as suas funções no organismo dos seres vivos estão a síntese protéica; o metabolismo do DNA e do RNA; o metabolismo energético, de carboidratos e de lipídios; além de sua destacada atuação na manutenção da imunocompetência do indivíduo (DUTRA-DE-OLIVEIRA e MARCHINI, 1998; GAUDREAU et al., 2001).

2.1.1 Alimentação

O zinco é encontrado em diversos alimentos, como por exemplo, nas ostras, crustáceos, carnes vermelhas, aves, alguns tipos de peixe, mariscos, feijões e nozes. De acordo com FISBERG (1998), acredita-se que apenas 20 a 40% do zinco da dieta sejam absorvidos. A absorção do zinco é alterada pela presença de diversos fatores dietéticos, principalmente pelos fitatos (ALLEN, 1998). A biodisponibilidade do zinco depende também da interação com outros minerais na luz intestinal. Pode existir uma competição zinco-cobre, ou zinco-cálcio, ou ainda zinco-ferro.

As necessidades diárias de zinco pelo ser humano são estimadas pela maioria dos países em 15 mg. WELCH (1993) citou que, segundo o Comitê de Alimentação e Nutrição da *National Academy of Sciences*, os valores diários de zinco recomendados variam de 5 a 19 mg/dia. A tabela 1 lista os valores específicos para cada faixa etária.

TABELA 1 – VALORES DIÁRIOS DE ZINCO RECOMENDADOS

Grupo Populacional	Faixa de idade (anos)	Valor recomendado na dieta (mg/dia)
Bebês	0-1	5
Crianças	1-10	10
Homens adultos	11-51 ou mais	15
Mulheres adultas	11-51 ou mais	12
Mulheres grávidas	Todas as idades	15
Mulheres lactentes	Primeiros 6 meses	19
	Após 6 meses	16

FONTE: WELCH, 1993

A *World Health Organization* (WHO) recomenda a ingestão de 12,8 a 54,5 mg de zinco/dia (FAO/WHO/ONU, 1985). Já a Portaria no. 33 cita que as dosagens de zinco de ingestão diária recomendada (IDR) são de 10 mg para crianças de 7 a 10 anos, 15 mg para adultos e gestantes (ANVISA, 1998).

O zinco é um microelemento necessário para vários processos celulares relacionados com o crescimento e diferenciação, transcrição e apoptose. Assim, o zinco é essencial para a vida, mas, como no caso de outros micronutrientes minerais, quando sua concentração intracelular ultrapassa um limite máximo, efeitos tóxicos se manifestam. Doses acima de 200 mg/dia de zinco são eméticas, isto é, provocam vômitos. Sinais típicos de toxicidade aguda causada por zinco em animais e no ser humano incluem dor epigástrica, diarreia, náusea e vômitos. A intoxicação pelo zinco também pode induzir uma deficiência secundária de cobre causada pela competição entre estes elementos pela absorção intestinal (DEVERGILIS et al., 2004).

Já a deficiência dos íons Zn^{2+} no organismo gera uma inibição do crescimento da célula e da atividade de fermentação (LIU et al., 1997). Levantamentos sobre a ingestão dietética de zinco realizados em diversos países mostram uma ocorrência elevada da deficiência deste nutriente (GIBSON e FERGUSON, 1998). Entre gestantes, estima-se que 82% destas em todo o mundo apresentem uma ingestão deficiente de zinco (SALGUEIRO et al., 2002). No Brasil, LETHI (1989) verificou que a maioria das grávidas e lactantes entrevistadas, de baixo nível socioeconômico na Amazônia, apresentava uma ingestão deficiente de zinco, entre 0 a 10 mg/dia.

2.1.2 Funções

O zinco, presente na forma biológica de íons Zn^{2+} , é componente essencial de mais de 300 enzimas, incluindo a RNA polimerase, a fosfatase alcalina, a álcool desidrogenase, a anidrase carbônica, e várias carboxipeptidases. Também realiza um papel estrutural crítico em muitas proteínas não catalíticas (BERG et al., 2002; GUERINOT e EIDE, 1999).

A mineralização dos ossos é descrita por BOUGLÉ et al. (2004) como uma das funções do zinco. De acordo com o estudo, a relação entre o zinco e a mineralização do osso é bastante significativa, pois o zinco aumenta a síntese e o efeito nos tecidos alvo de fatores de crescimento, como o fator 1 de crescimento insulina. Outra ação do zinco neste sentido é o estímulo da proliferação e da diferenciação dos osteoblastos, além da regulação da atividade dos hormônios reguladores do cálcio, da vitamina D e paratormônio (PTH). A influência do zinco na regulação destes hormônios aumenta a calcemia. Da mesma forma, este metal age sobre a fosfatase alcalina e a osteocalcina, substâncias que diminuem a calcemia. O zinco também previne a reabsorção do osso induzida pelo PTH (YOSHIWAKA et al., 2004).

KHALED et al. (1997) observaram que o zinco é um elemento traço que estabiliza membranas e interage com outros cátions bivalentes. Ele é um composto que forma a grande maioria das metaloproteínas. Ele também exerce efeitos semelhantes ao da insulina e aumenta a deformabilidade dos eritrócitos. Ele também está envolvido na fisiologia da insulina em vários níveis (BRANDÃO-NETO et al., 2003).

No cérebro, o zinco atua como um importante fator na neurotransmissão, através da modulação da atividade do glutamato e receptores de aminoácidos γ -butírico. Neurônios e terminações nervosas contendo zinco têm sido identificados em várias regiões do cérebro incluindo o hipocampo, córtex e cerebelo. Estudos usando fontes da dieta de zinco suplementadas com aminoácidos, como a metionina ou histidina, comprovaram que o metal das dietas com aminoácidos suplementados com zinco era mais biodisponível para o cérebro do animal testado do que as formulações do sal deste metal sozinho. Em particular, o zinco do complexo

histidina-zinco tem se mostrado ser melhor absorvido pelo cérebro do que o zinco de sais de zinco (KELLER et al., 2000).

2.2 FERMENTAÇÃO

2.2.1 Fermentação Líquida

A fermentação líquida é aquela em que o microrganismo se desenvolve em um meio líquido. Apesar deste tipo de fermentação ser o mais freqüentemente utilizado na maioria dos processos fermentativos industriais, a fermentação no estado sólido permanece como o método de escolha para muitos processos industriais tradicionais, especialmente para a indústria de alimentos (LIMA et al., 2001).

Uma vez que a cepa do microrganismo é encontrada, a produção da substância de interesse é primeiramente testada em um volume reduzido, utilizando-se fermentadores pequenos (de 1 a 5 L) e frascos. Entre os frascos utilizados, podem ser citadas as microplacas, os tubos de ensaio, os frascos Erlenmeyer, os frascos *Turnair* e *Carboys*. O equipamento utilizado para manter a movimentação destes frascos é chamado de *Shaker* ou agitador orbital (DEMAIN e DAVIES, 1999).

As fermentações líquidas em pequena escala são o tipo de cultivo mais utilizado, pois são facilmente operáveis e possuem baixo custo. Elas permitem que se tenha uma maneira econômica de avaliar uma grande variedade de parâmetros para a otimização do processo (DEMAIN e DAVIES, 1999).

Segundo HISS (2001), as fermentações descontínuas são utilizadas pela humanidade há milhares de anos e, atualmente, estão sendo utilizadas para a obtenção de vários tipos de produtos por meio de fermentações.

2.2.2 Meios de cultivo

Os meios de cultivo são projetados para atender à demanda nutricional do microrganismo produtor, aos objetivos do processo e à escala da operação. A seleção desses meios depende, na maioria dos processos em larga escala, do seu

custo, da sua disponibilidade e das propriedades de manejo dos componentes dos mesmos (BORZANI et al., 2001; RATLEDGE e KRISTIANSEN, 2002).

O valor do produto final está diretamente ligado ao custo dos ingredientes utilizados no meio de cultivo. Na indústria da fermentação, a contribuição das matérias primas no custo da produção final pode variar de 5 (como na produção de interferons e esteróides), até 50% (como na produção de etanol). A meta do processo fermentativo é sempre a redução do custo total através do aumento do rendimento da fermentação e da utilização de ingredientes com menor custo no processo (DEMAIN e DAVIES, 1999).

Os componentes básicos, nutricionalmente importantes, são as fontes de carbono, as fontes de nitrogênio, os sais minerais, e em alguns casos, fatores de crescimento. A maioria dos processos biotecnológicos industriais utiliza fontes de carbono e nitrogênio a partir de misturas complexas de produtos ou subprodutos naturais de baixo custo, buscando resíduos e águas residuárias com boa composição e em disponibilidade (BORZANI et al., 2001; DEMAIN e DAVIES, 1999).

As fontes de carbono, especialmente carboidratos, podem ser: a glicose (na forma de glicose pura ou amido hidrolisado), a lactose (como lactose pura, soro de leite ou de queijo, em pó), o amido ou fécula (que constitui a cevada, centeio, trigo, aveia), e a sacarose (presente no melaço de cana-de-açúcar e de beterraba). As fontes nitrogenadas podem ser a cevada, o soro de leite, a água de maceração de milho, a farinha de aveia, e a farinha de soja.

Os metais traço necessários geralmente estão presentes na água corrente ou na maioria das matérias primas. Os sais minerais são adicionados, especialmente como fontes suplementares de nitrogênio, fósforo, enxofre ou cálcio. A maioria dos fatores de crescimento necessária para o desenvolvimento do microrganismo pertence ao grupo das vitaminas B ou compostos afins, de certos aminoácidos ou de ácidos graxos. O adequado balanço de C/N pode ser fundamental, especialmente se o pH não for controlado (BORZANI et al., 2001; DEMAIN e DAVIES, 1999).

2.3 AS LEVEDURAS

Segundo BOURGEOIS e LARPENT (1995), as leveduras constituem na atualidade um grupo de microrganismos com ampla utilização, sendo aplicadas em um grande número de processos fermentativos e de produtos resultantes. São usadas como aditivos na alimentação humana e em forragens, pelo seu alto teor de proteínas, composição balanceada de aminoácidos, e elevada riqueza em vitaminas do complexo B (BEKATOROU et al., 2006; ICIDCA, 1999). Estes microrganismos também são objeto de crescente interesse no campo dos alimentos, devido ao seu valor nos aspectos nutritivo e aromático (BOURGEOIS e LARPENT, 1995).

Do ponto de vista tecnológico, as leveduras possuem vantagens em relação a outros microrganismos, principalmente em razão da sua capacidade de assimilar grande variedade de substratos, de sua alta velocidade de crescimento e da facilidade de separação de sua biomassa (ICIDCA, 1999).

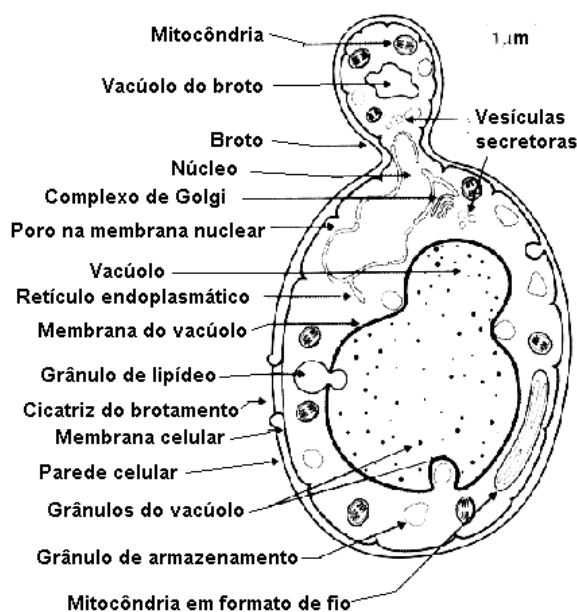
2.3.1 Aspectos Biológicos

As leveduras são microrganismos eucariotas. Constituem um grupo de organismos do tipo fungo, com predominância da forma unicelular e reprodução assexuada vegetativa por gemulação.

As células vegetativas da maioria das leveduras industriais variam em tamanho, de 4 a 8 μm de largura por 7 a 12 μm de comprimento, havendo, evidentemente, espécies maiores e espécies menores que as citadas. Forma e tamanho das células, mesmo em espécies monomorfas, podem variar de acordo com o nutriente, as condições ambientais, o estado fisiológico ou a idade (UFSC, 2007).

Segundo ESPOSITO e AZEVEDO (2004), do ponto de vista taxonômico, as leveduras são um grupo de microrganismos muito heterogêneos, compreendendo 60 gêneros e cerca de 500 espécies. Elas são classificadas em dois grupos, que se diferenciam por sua aptidão em formar ou não esporos de origem sexual: os ascomicetos, e os basidiomicetos. Na figura 1, é possível visualizar a estrutura e a reprodução de uma célula típica de levedura.

FIGURA 1 – ESTRUTURA E REPRODUÇÃO DE UMA CÉLULA TÍPICA DE LEVEDURA



FONTE: SCHOHN, 2007.

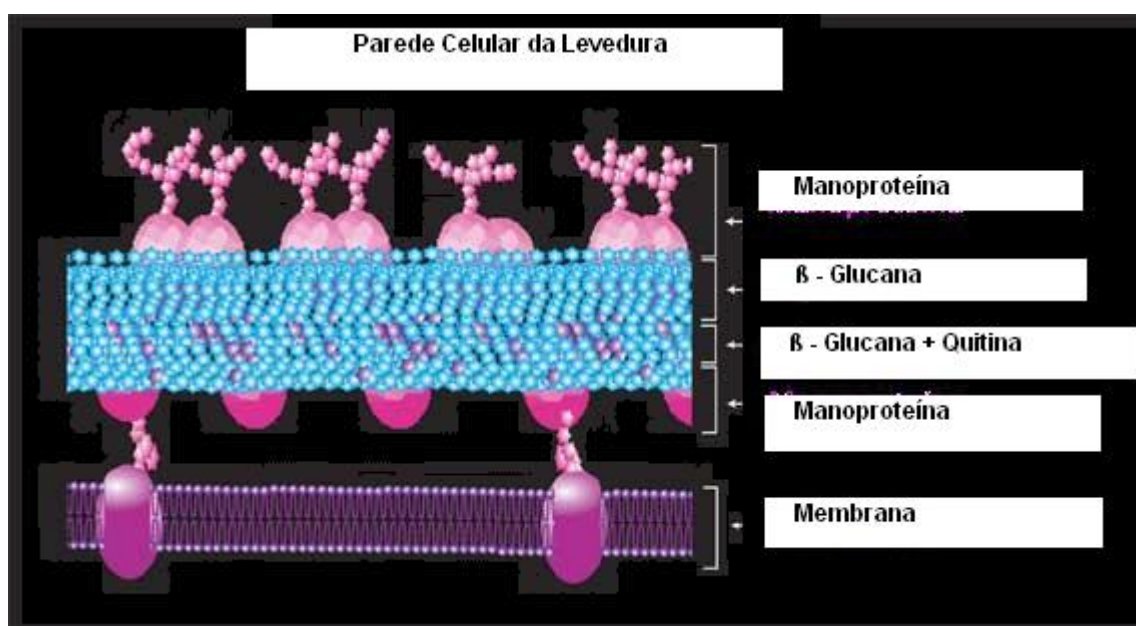
As leveduras apresentam um núcleo diferenciado e organelas subcelulares, como o retículo endoplasmático e as mitocôndrias. A morfologia celular, a formação de uma cápsula de polissacarídeos, a ausência ou presença de vacúolos de glóbulos de lipídeos, e o desenvolvimento das mitocôndrias dependem das condições físico-químicas e da idade do cultivo do microrganismo (BOURGEOIS e LARPENT, 1995).

A reserva de aminoácidos livres se localiza nos vacúolos. No conteúdo deles também estão purinas, ortofosfatos polimerizados e hidrolases (BOURGEOIS e LARPENT, 1995). Poucas organelas podem ser observadas através da luz do microscópio, a não ser que elas sejam especificamente marcadas. A única organela visível é um grande vacúolo central que contribui para a expansão celular. (GLAZER e NIKAIIDO, 1998).

A membrana celular é formada por três camadas: uma intermediária constituída por lipídios e fosfolipídios, e outras duas formadas por proteínas. Estas duas últimas intervêm na entrada e saída de solutos e nas reações enzimáticas. Somente a água difunde-se passivamente; para os outros solutos ocorre uma difusão facilitada ou um transporte ativo (BOURGEOIS e LARPENT, 1995).

A parede celular é rígida, bastante espessa, e responsável pela forma da célula. É formada principalmente por quitina, destinada especialmente às cicatrizes da gemulação (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; ASSIS, 1996). Esta parede não serve apenas para proteção e como estrutura, mas também é metabolicamente importante, estando envolvida com o transporte de nutrientes para o citoplasma. É formada por uma camada externa principalmente de manoproteínas; por uma camada intermediária de glucana, podendo esta ser subdividida em uma subcamada de β -glucana solúvel em álcali e outra subcamada de β -glucana insolúvel em álcali; e por uma camada interna, que é composta por manoproteína e outros tipos de proteína, incluindo enzimas como a invertase, fosfatase ácida, β -glucosidase e protease (BOURGEOIS e LARPENT, 1995; ASSIS, 1996) (ver figura 2).

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DA PAREDE CELULAR DE UMA CÉLULA TÍPICA DE LEVEDURA



FONTE: SIGMA ALDRICH, 2007.

Em algumas leveduras é possível observar a presença de uma cápsula constituída por fosfomananos solúveis e água (*Hansenula* e *Pichia*), mananos mais ou menos ramificados (*Rhodotorula*) ou heteropolissacarídeos (*Cryptococcus*). Algumas cepas de *Saccharomyces* possuem estruturas proteicas filamentosas que poderiam desempenhar um papel na floculação (BOURGEOIS e LARPENT, 1995).

Já foi relatado pela literatura que vários gêneros de leveduras chamadas de metilotróficas, como *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Hansenula*, são capazes de crescer em compostos de C₁ como o metanol, metilamina ou compostos similares, como única fonte energética de carbono (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

2.3.2 Aspectos Metabólicos

As leveduras são seres aeróbios e podem ser também aeróbios facultativos, logo conseguem crescer na presença ou ausência de oxigênio. Elas podem metabolizar várias fontes de carbono, mas utilizam principalmente açúcares, como a sacarose, a glicose, e a maltose. Algumas leveduras podem usar uma série de fontes não convencionais de carbono, como os biopolímeros, as pentoses, os alcóois, os polióis, os hidrocarbonetos, os ácidos graxos e os ácidos orgânicos (BEKATOROU et al., 2006; FERREIRA, 1995).

De acordo com BEKATOROU et al. (2006), a maioria das cepas de levedura é capaz de assimilar diretamente íons de amônio e uréia, porém poucas espécies possuem a capacidade de utilizar nitratos com fonte de nitrogênio. O fósforo e o enxofre são geralmente assimilados na forma de íons inorgânicos de fosfatos e sulfatos, respectivamente. Além disso, os metais são essenciais para estes microrganismos e, por isso, são adicionados ao meio de cultivo.

O crescimento das leveduras como organismos heterotróficos depende de uma variedade de compostos orgânicos e de alguns nutrientes minerais. Estes compostos são degradados por um conjunto de reações químicas que ocorrem no interior da célula – o metabolismo. Durante o crescimento, as células utilizam os substratos de forma a satisfazer a síntese de material celular, energia (através do ATP) e poder redutor (na forma de nucleotídeos de piridina – NADH) expresso no potencial de óxido-redução. O catabolismo é o conjunto de reações metabólicas que permite executar os dois últimos requisitos. Ao conjunto de reações metabólicas envolvidas na síntese de material celular dá-se o nome de anabolismo. Num meio aeróbio, o poder redutor é convertido em energia adicional através de um processo chamado fosforilação oxidativa (FERREIRA, 1995).

2.3.3 Leveduras para consumo animal e humano

As leveduras foram os primeiros microrganismos utilizados na produção de proteínas, são os que receberam maior atenção de estudos e são aqueles com maior aceitação pelos consumidores. Isto se deve principalmente ao fato de que raramente são tóxicas ou patogênicas. Apesar de seu teor de proteínas não exceder 60%, sua concentração de aminoácidos essenciais, como lisina, triptofano e treonina, é satisfatória. Além disso, possuem pequenas quantidades de aminoácidos sulfurados, como a metionina e a cisteína. Outras vantagens destacadas para leveduras devem-se ao fato de elas serem maiores que as bactérias, facilitando sua separação; e de poderem ser utilizadas em seu estado natural. Entretanto, sua taxa de crescimento específico é relativamente baixa, com um tempo de geração de 2 a 5 horas.

Nos últimos anos, outras leveduras - além da *S. cerevisiae* - têm despertado interesse industrial como produtoras de proteínas heterólogas. Exemplos destas leveduras são aquelas que utilizam o metanol, como a *Hansenula polymorpha* e *Pichia pastoris*; e as espécies que degradam a lactose, como *Kluyveromyces lactis*, *K. fragilis* e *K. marxianus*. A aplicação destas leveduras em fermentações em larga escala para a produção de proteínas heterólogas tem se tornado uma prática industrial comum (PINHEIRO et al., 2000). Na tabela 2 encontram-se as espécies de leveduras utilizadas na produção de *Single Cell Protein* (SCP), de acordo com a fonte de carbono utilizada.

TABELA 2 – MICRORGANISMOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE SCP, DE ACORDO COM A FONTE DE CARBONO UTILIZADA.

Substrato	Microrganismo
n-alcanos, n-parafinas	<i>Candida lipolytica</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. maltosa</i> , <i>C. paraffinica</i> , <i>C. oleophils</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>
Metanol	<i>Candida utilis</i> , <i>Hanseniaspora</i> sp., <i>Pichia pastoris</i> , <i>Hansenula</i> sp., <i>Kloeckera</i> sp.
Etanol	<i>Candida ethanophila</i> , <i>C. utilis</i> , <i>C. kruzei</i>
Soro de leite	<i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>Candida intermedia</i>
Melaço de cana-de-açúcar	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Amido	<i>Schwanniomyces alluvius</i> , <i>Lipomyces kononenkoe</i>
Lipídios	<i>Candida rugosa</i> , <i>C. utilis</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>C. blankii</i> , <i>C. curvata</i> , <i>C. derfomans</i> , <i>C. parapsilosis</i>
Celulose	<i>Candida utilis</i>
Liquor residual de sulfitos	<i>Candida utilis</i> , <i>C. tropicalis</i>

FONTE: PINHEIRO et al., 2000

Entre as leveduras citadas na literatura como possuindo uma alta produção de biomassa estão *K. fragilis*, com 90 g/L (SHAY et al., 1987); *S. cerevisiae*, com 40 a 45 g/L (LITCHFIELD, 1979); e *P. pastoris*, com 105 g/L (SHAY et al., 1987).

O alto conteúdo relativo de proteínas e a baixa proporção de ácidos nucleicos permitem seu uso na forma de aditivos, ou como complemento na formulação de diferentes tipos de alimentos para o consumo animal e humano. A proporção a ser empregada está diretamente relacionada com o tipo de alimento, forma de suplementação, propriedades funcionais e resultados organolépticos em cada uma das formulações (ICIDCA, 1999).

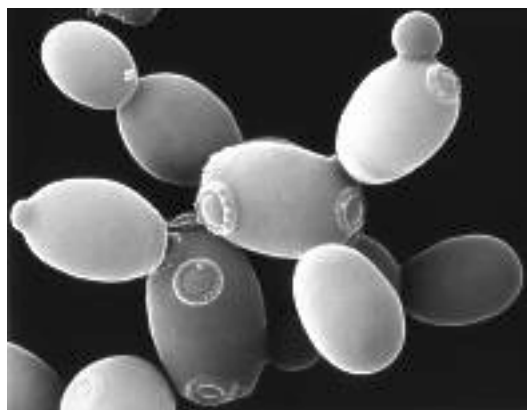
2.3.4 Gêneros

2.3.4.1 Gênero *Saccharomyces*

A levedura de panificação *S. cerevisiae* é um microrganismo facultativo, isto é, é capaz de crescer com ou sem aerobiose. Quando ocorre o crescimento em presença de oxigênio, este gênero de levedura exige a biotina no meio de cultivo. Ao se desenvolver em absoluta anaerobiose, quando mesmo traços de oxigênio são evitados, outros componentes, como ácidos graxos insaturados e ergosterol, são necessários (LIMA et al., 2001).

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura que se reproduz através de brotamento, e é utilizada para a fabricação do pão, onde o dióxido de carbono produzido pelo crescimento da massa gera o crescimento do pão (ver foto 3). Também é utilizada na produção de cervejas, vinhos e outras bebidas alcoólicas.

FIGURA 3 – FOTO EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE *Saccharomyces cerevisiae*



FONTE: WHEALS, 2007.

O ciclo do *S. cerevisiae* é muito rápido, quando comparado com o de outros microrganismos, alcançando uma fase exponencial em 24 horas, dependendo das condições da cultura. A espécie *Saccharomyces cerevisiae*, quando semeada em meio extrato de malte, após três dias a 25 °C, apresenta células que podem ser globosas ou subglobosas, elipsóides a cilíndricas, células alongadas de mais de 30 µm de comprimento podem estar presentes, sendo que estas células aparecem sozinhas, em pares, em cadeias pequenas ou agrupamentos. Um sedimento é produzido, assim como também ocasionalmente um leve anel é formado. Ela fermenta glicose, sendo que o crescimento em galactose, sacarose e maltose devem ser testados. Não assimila nitratos, e o desenvolvimento em meio com ausência de vitaminas, assim como o crescimento a 37 °C, devem ser testados (KURZMAN e FELL, 1998).

Este gênero foi escolhido para ser largamente utilizado como o organismo responsável pela produção de SCP por várias razões, como: sua fácil manipulação; seu fácil crescimento; seu metabolismo extensivamente estudado; seu crescimento em altas concentrações de substrato; seu reconhecimento como sendo seguro (fato importante para um produto com grau alimentício de segurança).

O desenvolvimento de uma cepa mutante de *S. cerevisiae* tolerante a altas concentrações de cloreto de sódio foi estudado por MATSUTANI et al. (1992). O mutante osmotolerante da cepa apresentou uma diminuição drástica no tamanho da célula, e tornou-se resistente a meios com concentrações de até 18% de cloreto de sódio.

2.3.4.2 Gênero *Kluyveromyces*

A espécie *K. marxianus* apresenta um grande potencial para ser empregada tanto na indústria farmacêutica como na de alimentos. Ela tem sido utilizada na produção em larga escala de proteína unicelular (SCP) a partir de soro de leite. É reconhecida como um microrganismo seguro para o consumo humano (GRAS) pelo FDA (CABALERRO et al., 1995). Possui grande capacidade de conversão de substratos em biomassa, e uma baixa taxa de formação de metabólitos, como o etanol (BELLAYER et al., 2004). Entretanto, a produção de SCP a partir da fermentação do *K. marxianus* ainda não atingiu seu uso extensivo, devido a fatores econômicos (CABALERRO et al., 1995).

A espécie *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*, após semeadura em meio de extrato de malte, em 3 dias a 25 °C, desenvolve células subglobulares, elipsóides a cilíndricas, reproduzindo-se por gemulação, e se dispõe sozinha, em pares, e às vezes em pequenas cadeias. Um pseudomicélio é sempre formado em menor ou maior extensão. Um sedimento é produzido assim como também ocasionalmente um leve anel. Ela fermenta glicose, galactose, sacarose, rafinose e inulina. Também assimila compostos de carbono da galactose, sacarose, celobiose, lactose, rafinose, xilose, entre outros. Não assimila nitratos, e não se desenvolve em meio com ausência de vitaminas. Cresce a 37 °C (KURZMAN e FELL, 1998). Em cultivos típicos de *Kluyveromyces*, altas densidades celulares são atingidas e o oxigênio é sempre o principal fator limitante do crescimento (PINHEIRO et al., 2000).

YAZGAN e OZCENGİZ (1994) relataram que a espécie *S. cerevisiae* é significativamente menos efetiva do que a *K. marxianus* na biosorção de muitos metais. Esta última demonstrou ser uma das espécies de levedura mais promissoras, ao acumular 90% do metal prata presente no meio, assim como 60% dos teores de cobre e cádmio. Uma análise posterior das proteínas destes

microrganismos que sofreram a exposição aos metais mostrou uma alta produção de metalotioneínas pelo *K. marxianus*.

2.3.4.3 Gênero *Pichia*

A espécie *Pichia guilliermondii*, quando semeada em meio ágar de extrato de malte a 5%, após três dias a 25 °C, apresenta células que podem ser de ovais a alongadas, e que aparecem sozinhas, em pares, ou em cadeias pequenas. Ela fermenta os seguintes açúcares: glicose, sacarose, rafinose e trealose. Além disso, possui a capacidade de assimilar compostos de carbono proveniente de galactose, sacarose, maltose, celobiose, trealose, rafinose, xilose, entre outros. Não assimila nitratos, e não se desenvolve em meio com ausência de vitaminas. Cresce a 37 °C (KURZMAN e FELL, 1998). Esta espécie é destacada por CHOI e PARK (1999) como sendo uma levedura osmotolerante, e apresentou a maior taxa de crescimento e teve o maior crescimento total, entre as quatro espécies estudadas pelos pesquisadores. Seu máximo crescimento celular foi obtido a 30 °C, e não foi influenciado por concentrações de até 12% de cloreto de sódio.

A espécie *P. guilliermondii* é conhecida como sendo osmotolerante (BAPTISTA et al., 2004; CHOI e PARK, 1999). Também existem relatos na literatura do uso desta espécie como um microrganismo antagonista no controle biológico de doenças fúngicas de pós-colheita em frutas (DROBY et al., 1993; BAPTISTA et al., 2004; SALIGKARIAS et al., 2002).

Já a *Pichia pastoris* é uma levedura metilotrófica, que tem se mostrado um microrganismo interessante na produção de alta concentração de proteínas tanto secretadas como intracelulares. Tem potencial para alta expressão, possui secreção eficiente e crescimento até altas densidades celulares (CHAUHAN et al., 1999). Esta cepa, após semeadura em meio ágar extrato de malte a 5%, em 3 dias a 25 °C, desenvolve células esféricas a ovais, e se dispõe sozinha ou em pares. Ela somente fermenta a glicose, assimila compostos de carbono da trealose, ramnose, manitol e ácido succínico. Não assimila nitratos, e não se desenvolve em meio com ausência de vitaminas. Cresce a 37 °C (KURZMAN e FELL, 1998).

Em comparação com o *S. cerevisiae*, o gênero *Pichia* pode ter algumas vantagens na glicosilação das proteínas secretadas, e conseqüentemente na

produção de proteínas, já que a *Pichia* não realiza a hiperglicosilação em muitas ocasiões. Como consequência, o comprimento das cadeias de oligossacarídeos adicionadas após a transdução das proteínas é muito menor do que daquelas presentes no *S. cerevisiae* (CHOI e PARK, 1999).

2.4 PRODUÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES DE ZINCO ORGÂNICO

2.4.1 Legislação

A segurança do uso de produtos de origem microbiana para alimentação animal e humana depende da seleção dos microrganismos, do substrato, do processo, e das características do microrganismo. Os pré-requisitos para a aprovação de proteínas com fins alimentares podem ser classificados conforme a espécie. Se a proteína for utilizada na alimentação animal, deve-se comprovar a segurança da espécie utilizada, dos substratos, dos produtos e o valor nutricional adequado. Já para o consumo humano, é preciso observar todos os pontos acima especificados, além da ausência de mutagenicidade, teratogenicidade, mínima alergenicidade, características organolépticas e/ou funcionais, e aceitabilidade cultural.

O Ministério da Agricultura, em 2003, estabeleceu a Portaria n. 384, que dispõe, além da definição de aditivos para uso em alimentos para animais, as diretrizes e procedimentos para o uso seguro dos aditivos na alimentação dos animais, para o homem, os animais e o meio ambiente, de forma que não induzam ao erro o usuário, que não afetem negativamente as características distintas do produto, e que tenham sido objeto de um registro de acordo com as evidências científicas aplicáveis à segurança dos alimentos (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2004).

O Ministério da Saúde (MS) definiu que os suplementos, tanto vitamínicos quanto minerais, são alimentos que servem para complementar a dieta diária de uma pessoa saudável, nos casos em que a ingestão desses nutrientes, a partir da alimentação, seja insuficiente. Nos suplementos, cada nutriente deve conter um mínimo de 25% e no máximo até 100% da Ingestão Diária Recomendada (IDR), na porção diária indicada pelo fabricante, não podendo substituir os alimentos, nem ser

considerado como componente exclusivo da dieta. São considerados suplementos: vitaminas isoladas ou associadas entre si, minerais isolados ou associados entre si, associações de vitaminas com minerais e produtos fontes naturais de vitaminas e ou minerais, legalmente regulamentados em conformidade com a legislação pertinente (ANVISA, 1998).

A *Association of American Feed Control Officials* é um órgão que regula a qualidade e a segurança de produtos para a alimentação de animais nos Estados Unidos, oferecendo padrões para a fabricação, distribuição e venda de dietas animais (AAFCO, 2000). Ela estabeleceu a seguinte definição de minerais orgânicos: “são íons metálicos ligados quimicamente a uma molécula orgânica, formando estruturas com características únicas de estabilidade e alta disponibilidade mineral”.

2.4.2 Produção de *Single Cell Protein* (SCP)

O uso de microrganismos com interesses nutricionais na alimentação teve início no final da 2ª. Guerra Mundial, e os alemães foram os pioneiros na aplicação de leveduras na alimentação animal e humana. Este produto foi chamado de *Single Cell Protein* (SCP), que se refere à produção de proteínas unicelulares.

Microrganismos como algas (*Spirulina*, *Chlorella*, *Laminaria*, *Rhodomenia*), bactérias (*Lactobacillus*, *Cellulomonas*, *Alcaligenes*), leveduras (*Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis*) e fungos (*Aspergillus*, *Penicillium*) são considerados como fontes de proteína. Entre as espécies de leveduras, *S. cerevisiae* e *C. utilis* são amplamente utilizadas para o consumo humano (BEKATOROU et al., 2006).

A aceitabilidade de um microrganismo em particular para o uso na alimentação humana e animal depende de seu valor nutricional e sua segurança (incluindo o teor de ácidos nucleicos, presença de toxinas e compostos residuais indesejáveis) (BEKATOROU et al., 2006).

As inúmeras vantagens para o uso de microrganismos na produção de SCP, quando comparadas com fontes habituais de proteína (como a carne ou a soja) são conhecidas. Os microrganismos possuem alto teor de proteínas e elevada velocidade de crescimento, o que leva a uma rápida produção de biomassa, sendo

que esta pode ser contínua e independe das condições do ambiente (BEKATOROU et al., 2006).

O microrganismo ideal para a produção de SCP deve possuir uma série de características tecnológicas, entre elas: alta taxa de crescimento específico e rendimento de biomassa; alta afinidade pelo substrato; poucas necessidades nutricionais; habilidade em desenvolver alta densidade celular; capacidade para modificações genéticas; uma composição balanceada de proteínas e lipídeos e baixo teor de ácidos nucleicos; boa digestibilidade; e atoxicidade.

2.4.3 Metais Orgânicos

Os minerais traço têm sido tradicionalmente adicionados a dietas de animais na forma inorgânica, isto é, na forma de sais inorgânicos. Entretanto, nos últimos anos, tem crescido o interesse na alimentação com minerais traço de origem orgânica. Minerais orgânicos são combinações de um ou mais minerais com substâncias orgânicas, como por exemplo, um ou mais aminoácidos, carboidratos ou até mesmo proteínas.

Este interesse tem sido estimulado por pesquisas que demonstram uma melhora no crescimento, reprodução e sanidade dos animais alimentados com minerais orgânicos (SPEARS, 1996). Entre os motivos da melhor atividade dos metais orgânicos estão: sua absorção pelo organismo próxima a 100%; alta estabilidade; alta disponibilidade biológica; maior tolerância do organismo animal ao metal, ou seja, é menos tóxico; ausência de problemas de interações com outros macro e microminerais da dieta, o que pode acarretar na insolubilização de parte dos minerais; ausência de problemas de interações com outros nutrientes da dieta, como gordura e fibras, que podem formar ligações indesejáveis com os metais (BARUSELLI, 2005).

Suplementos de minerais traço orgânicos comercialmente disponíveis variam de acordo com o tipo de ligante ou ligantes utilizados na forma de metal complexado ou quelado. A classificação estabelecida pela AAFCO para os vários tipos de produtos de minerais orgânicos é ilustrada na tabela 3.

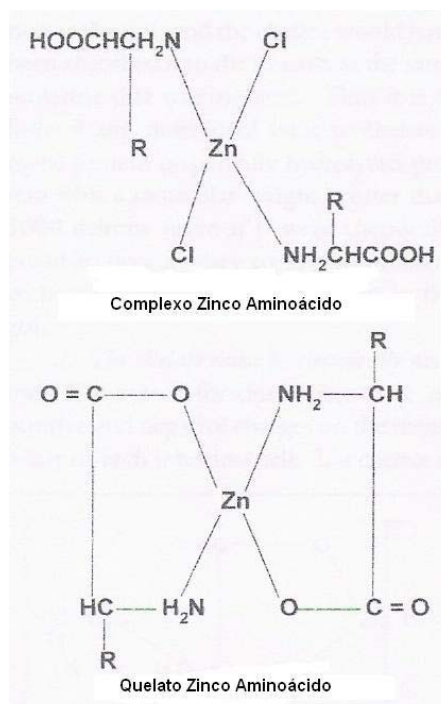
TABELA 3 – DEFINIÇÕES DOS PRODUTOS DE MINERAIS ORGÂNICOS DE ACORDO COM A ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE AUTORIDADES NO CONTROLE DE ALIMENTOS PARA ANIMAIS

Produto orgânico mineral	Definição
Complexos	
Complexo metal - aminoácido	O produto resultante da complexação de um sal metálico solúvel com um ou mais aminoácidos
Complexo metal – aminoácido específico	O produto resultante da complexação de um sal metálico solúvel com um aminoácido específico
Complexo metal - polissacarídeo	O produto resultante da complexação de um sal metálico solúvel com uma solução do polissacarídeo ingrediente do complexo do metal específico
Quelatos	
Quelato metal-aminoácido	O produto resultante da reação de íon metálico de um sal metálico solúvel com aminoácidos com uma razão molar de um mol de metal para um a três (preferencialmente dois) moles de aminoácidos para formar ligações covalentes coordenadas. O peso molecular médio do aminoácido hidrolisado deve ser de aproximadamente 150 daltons e o peso molecular resultante do quelante não deve exceder 800 daltons.
Metal proteinato	O produto resultante de uma quelação de um sal solúvel com aminoácidos e/ou proteína parcialmente hidrolisada.

FONTE: AAFCO, 2000

Na figura 4, é possível visualizar a diferença entre as estruturas do complexo zinco aminoácido e do quelato zinco aminoácido.

FIGURA 4 – DIFERENÇA ESTRUTURAL ENTRE UM COMPLEXO ZINCO AMINOÁCIDO E UM QUELATO ZINCO AMINOÁCIDO



FONTE: ALBION LABORATORIES, 2000.

Os complexos e os quelatos formados são estáveis no trato digestório, e estão assim protegidos da formação de complexos com outros componentes da dieta que iriam de outra forma inibir sua absorção. No metabolismo animal, os elementos traço ocorrem e funcionam na forma de complexos orgânicos, ou de quelatos orgânicos, e não como íons inorgânicos livres. Além disso, a utilização de minerais traço depende da habilidade do animal em convertê-los para formas orgânicas biologicamente ativas. Os minerais traço presentes naturalmente na alimentação também existem primariamente como quelatos ou complexos orgânicos (USHIDA et al., 2001).

2.4.4 Opções de organismos para a produção de suplementos alimentares de zinco orgânico

A alta capacidade de ligação a metais e a capacidade de acúmulo dos mesmos por uma ampla variedade de organismos tem sido apresentada na literatura, como pode ser observado na Tabela 4. Entre eles estão as algas marinhas (AHUJA et al.,

1999), as bactérias (MATTUSCHKA e STRAUBE, 1993; MAMERIN et al., 1999) as leveduras (KROGH et al., 1998; AKAR e TUNALI, 2005), e fungos (GALUN et al., 1987; PURANIK e PAKNIKAR, 1997; IQBAL e EDYVEAN, 2004; BAIK et al., 2002). É importante ressaltar que todos estes microrganismos são utilizados na produção de biomassa, sendo considerados fontes de proteínas (ver tabela 4).

TABELA 4 - ACÚMULO DE ZINCO PELA BIOMASSA DE VÁRIOS ORGANISMOS CITADOS PELA LITERATURA

Organismo estudado	Processo de Incorporação	Concentração de Zinco (mg kg^{-1} Peso Seco de Biomassa)	Bibliografia
Cianobactérias			
<i>O. angustissima</i>	Adsorção	641.000	AHUJA et al., 1999
Fungos			
<i>P. digitatum</i>	Adsorção	9.700	GALUN et al., 1987
<i>S. cinnamomeum</i>	Adsorção	21.300	PURANIK e PAKNIKAR, 1997
<i>P. chrysosporium</i>	Adsorção	50.900	IQBAL e EDYVEAN, 2004
<i>M. rouxii</i> / Tratamento com NaOH	Adsorção	34.580	BAIK et al., 2002
<i>R. oryzae</i> / Tratamento com NaOH	Adsorção	35.880	BAIK et al., 2002
Bactérias			
<i>S. noursei</i>	Adsorção	1.600	MATTUSCHKA e STRAUBE, 1993
<i>S. rimozus</i> / Tratamento com NaOH	Adsorção	80.000	MAMERIN et al., 1999
Leveduras			
<i>B. cinerea</i>	Adsorção	12.980	AKAR e TUNALI, 2005
<i>A. pullulans</i>	Adsorção/Absorção	104	KROGH et al., 1998
<i>S. cerevisiae</i>	Adsorção/Absorção	700	STEHLIK-THOMAS et al., 2004
Plantas			
<i>S. townsendii</i>	Adsorção	36.000	DOYLE e OTTE, 1997
<i>A. portulacoides</i>	Adsorção	190.000	DOYLE e OTTE, 1997
Folhas de <i>T. grandis</i>	Adsorção	16.420	PRASANNA KUMAR et al., 2006

2.4.4.1 Produção de suplementos alimentares de zinco orgânico utilizando a fermentação líquida de leveduras

As leveduras são conhecidas por sua habilidade em acumular metais de soluções aquosas através de interações físico-químicas, como a adsorção e a absorção, ou de mecanismos dependentes do metabolismo. A célula da levedura com sua complexa parede celular representa um sítio adicional de adsorção em relação às células desprovidas de parede (GADD, 1990). Este processo depende da disponibilidade de grupos funcionais na superfície da célula e da natureza do metal. Entre os fatores que influenciam na seletividade da captura do metal estão a concentração de íons livres, a eletronegatividade do ligante, o cátion metálico, e a carga do ligante.

A estrutura da parede celular e o estado metabólico da célula dependem da composição do substrato, logo o crescimento em diferentes meios é influenciado pela capacidade e seletividade da captura do metal. Estas características podem ser potencializadas através da criação de novos sítios de ligação ou de variados sistemas enzimáticos no interior da célula (ENGL e KUNZ, 1995).

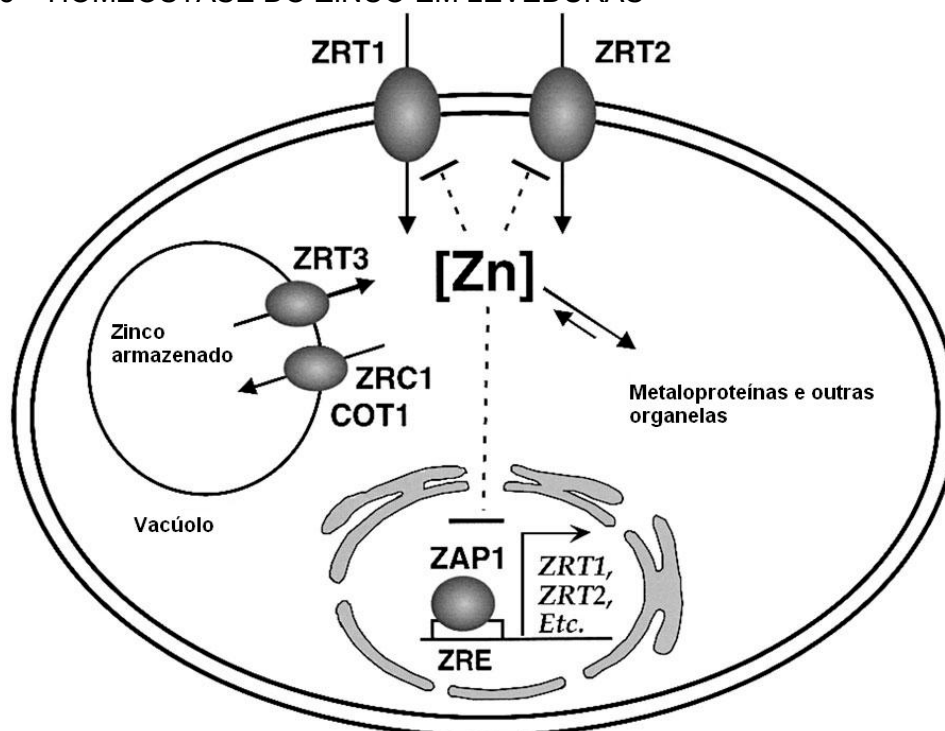
A levedura *S. cerevisiae* é um poderoso modelo na investigação dos mecanismos de captura de metais. Seu sistema de transporte consiste em transportadores de baixa e alta afinidade. Os transportadores de alta afinidade são seletivos para seus metais alvo e são finamente regulados de acordo com o metal desejado. Já os transportadores de baixa afinidade têm baixa participação na reposição das necessidades dos metais e são menos seletivos com relação aos metais a serem transportados (RADISKY e KAPALN, 1999). *S. cerevisiae* possui múltiplos transportadores de zinco que permitem a absorção deste metal (GAUDREAU et al., 2001).

Um aspecto pertinente à captura do metal zinco por leveduras é que este mecanismo, como para qualquer íon metálico sozinho, é mediado por dois ou mais sistemas substrato específicos. A razão para este fato ainda é desconhecida (EIDE, 1997).

A homeostase do zinco em leveduras, ilustrada na figura 5, é realizada através dos transportadores de membrana Zrt1p e Zrt2p. Uma vez dentro do citoplasma, o metal se liga às metaloproteínas ou é transportado para as organelas, como as

mitocôndrias. Em células com alta concentração de zinco em seu interior, os transportadores Zrc1p e Cot1p transportam o zinco para o interior dos vacúolos, onde ele é armazenado em uma forma menos tóxica. O fator de transcrição Zap1p é reprimido por uma concentração intracelular de zinco lábil. Quando o zinco se torna limitante, a atividade de Zap1p aumenta a transcrição dos genes dos transportadores *ZRT1*, *ZRT2* e *ZRT3*. A expressão intensificada do transportador Zrt3p mobiliza o transporte do zinco presente nos vacúolos para o citoplasma para abastecer a quantidade de zinco lábil. Paradoxalmente, o gene *ZRC1* é também induzido pelo Zap1p, o que sugere uma necessidade na manutenção do fluxo de zinco através dos vacúolos em células com limitação de zinco. Se o nível de zinco celular aumentar até níveis extremamente altos, ou seja, quando células com deficiência neste metal forem expostas a altas concentrações do mesmo, o zinco intracelular irá sinalizar a endocitose dos transportadores Zrt1p e Zrt2p. Estas proteínas são subsequentelemente degradadas no vacúolo. Logo, a homeostase do zinco representa um balanço entre estes sistemas de regulação da transcrição e pós-translação e as proteínas transportadoras que eles controlam (GITAN et al., 1998).

FIGURA 5 – HOMEOSTASE DO ZINCO EM LEVEDURAS



FONTE: MACDIARMID et al., 2007.

De acordo com BRADY e DUNCAN (1994), as leveduras acumulam metais através de dois processos distintos. No primeiro, existe uma rápida etapa inicial de acúmulo que é independente do metabolismo e de temperatura, e está relacionada com a ligação dos cátions na superfície da parede celular. Os metais são retidos na parede celular e subseqüentemente adsorvidos em sítios de ligação aniônicos presentes na estrutura da célula. Este processo de captura é independente do ciclo metabólico biológico, e é conhecido como biosorção ou “captura passiva”. A biosorção é reversível, e tem como vantagem a desorção dos metais ligados (VOLESKY e MAY-PHILIPS, 1995; YAZGAN e OZCENGIZ, 1994; GAUDREAU et al., 2001). VOLESKY e MAY-PHILLIPS (1995) sugeriram que as diferenças na capacidade da ligação de metais na superfície do microrganismo devem-se às diferenças na estrutura da parede celular.

Esta etapa pode ser seguida por um segundo processo, que é dependente do metabolismo do microrganismo, é mais lento, e pode acumular quantidades maiores de cátions do que o primeiro processo (BRADY e DUNCAN, 1994). Os metais atravessam a membrana celular, penetrando no interior da célula, através do ciclo metabólico da mesma. Este processo de captura do metal é conhecido como absorção ou “captura ativa”.

Quando o metal é capturado tanto de forma passiva como ativa pelo microrganismo, este processo é chamado de bioacumulação (VOLESKY e MAY-PHILIPS, 1995). BRADY e DUNCAN (1994) demonstraram que somente quando a maioria dos sítios de ligação aniônicos, presentes na parede celular, está ocupada, é que se inicia o processo de acúmulo do cátion do metal no interior da célula de *S. cerevisiae*.

A maioria dos metais intracelulares encontra-se ligado a grânulos de polifosfato localizados no interior da célula, localizados dentro ou próximos de vacúolos, ou ligados a proteínas de baixo peso molecular, conhecidas como metaloproteínas e fitoquelatinas (VOLESKY e MAY-PHILIPS, 1995; YAZGAN e OZCENGIZ, 1994; GUERINOT e EIDE, 1999). KSHEMINSKA et al. (2005) demonstraram a formação de estruturas similares no interior da célula e o aparecimento de grânulos de coloração escura encontrados em regiões conhecidas como vacúolos, quando estudada a bioacumulação de cromo pela cepa *P. guilliermondii* ATCC 201911, através de microscopia eletrônica.

A maioria dos estudos onde ocorre a absorção de metais utilizando microrganismos na etapa de crescimento descreve o processo como sendo bifásico, isto é, uma fase inicial rápida de biosorção, seguida por uma etapa mais lenta, ativa e dependente do metabolismo, que é a absorção (MALIK, 2004).

Apesar do alto poder de biosorção de vários tipos de biomassa microbiana morta/pré-tratada ter sido relatado, sua aplicabilidade ainda deve ser testada. Os métodos de biosorção são sensíveis a condições do ambiente, como pH, força iônica e a presença de ligantes orgânicos e inorgânicos. Na maioria dos estudos onde se utilizou biomassa morta de microrganismos para o acúmulo de metais, estes não foram levados até o interior da célula; ficando adsorvidos na superfície da célula, e assim, apenas uma pequena fração da capacidade de bioacumulação do cátion do metal foi explorada (MALIK, 2004).

Já a aplicação de células ativas e em crescimento pode ser uma melhor opção, devido ao seu seqüestro contínuo metabólico de metais após a adsorção física; e ao seu potencial na otimização, através do desenvolvimento de espécies resistentes e modificação da superfície celular. Além disso, as células metabolicamente ativas que se encontram na fase de crescimento exponencial provavelmente apresentam uma alta concentração de enzimas, sendo que algumas delas podem estar envolvidas na complexação e ligação de íons metálicos (KRAUTER et al., 1996).

Apesar disso, existem limitações práticas para a captura de metais utilizando células vivas, como a sensibilidade do sistema a pHs extremos, altas concentrações de metal/sal, e necessidades de energéticas supridas por fontes externas. Apesar disso, estes problemas podem ser resolvidos através da seleção de cepas e da exploração de resíduos orgânicos, como as fontes de carbono (RADISKY e KAPALN, 1999).

Os metais de transição são essenciais na função de muitas proteínas, tanto pelo fato de facilitarem as reações redox como também por estabilizarem a estrutura da proteína. Para adequar-se às necessidades por estes metais, as células possuem numerosos mecanismos para a solubilização e captura de metais do meio extracelular. As células devem, entretanto, simultaneamente proteger a si mesmas dos danos inerentes na versatilidade destes metais, pois as reações redox podem produzir radicais livres tóxicos se as concentrações do metal no ambiente intracelular não forem cuidadosamente reguladas (RADISKY e KAPALN, 1999).

A chave para a maioria das interações entre metal e microrganismo, e para o desenvolvimento de processos, está na resistência do microrganismo ao metal. Ele reage com o metal, é resistente ao mesmo, e, além disso, mantém todas as suas atividades metabólicas. Pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de se encontrar uma explicação genética para o fenômeno da resistência dos microrganismos aos metais. O ponto focado é a análise das cargas cromossômica e extra-cromossômica, as quais possuem uma relação direta com a resistência a metais (AGATE, 2003).

O isolamento e seleção de cepas resistentes ao metal é uma etapa crucial para superar a principal barreira do uso de células vivas. Incidentalmente, os microrganismos mais resistentes ligam-se substancialmente a uma maior quantidade de metal, o que é um pré-requisito para aumentar a bioprecipitação/acúmulo intracelular e o desenvolvimento de um processo eficiente. É importante garantir que as células em crescimento possam manter uma capacidade constante de remoção após múltiplos ciclos de bioacumulação/desorção (MALIK, 2004).

Uma forma de tornar um microrganismo mais resistente e eficiente ao acúmulo de metais é através da adaptação de suas células ao aumento progressivo de concentrações maiores de metal (DONMEZ e AKSU, 1999). DONMEZ e AKSU (2001) adaptaram cepas de *Candida*, isoladas do ambiente, para os metais níquel e cobre, através de subculturas seriadas em meios de cultivo enriquecidos com estes metais. As células adaptadas cresceram bem na presença de altas concentrações do metal, enquanto que as não adaptadas morreram. Além disso, as capacidades específicas de retenção do metal e de remoção das células adaptadas foram maiores do que a das não adaptadas em todas as concentrações testadas.

2.4.4.1.1 Fatores que influenciam no acúmulo do zinco pelas leveduras

O acúmulo de metais por leveduras é influenciado por uma série de fatores, como as propriedades físico-químicas do metal; a fisiologia da célula; e as condições do ambiente, como pH e temperatura. Além disso, a internalização depende de metabolismo dos íons metálicos, e pode ser influenciada pela presença de cátions de metais competidores, ou pela falta de fonte energética (STOLL e DUNCAN, 1996).

2.4.4.1.1.1 Metais

Existem poucos relatos de estudos sobre a relação entre os diferentes mecanismos e/ou níveis relativos de captura de metal ou toxicidade com as características químicas dos metais estudados. Os metais pesados, que são geralmente não tóxicos e são macronutrientes essenciais para o crescimento dos microrganismos, ligam-se geralmente a ligantes (duros) contendo oxigênio, enquanto que os metais leves, que freqüentemente oferecem maior toxicidade, formam ligações mais estáveis com ligantes contendo nitrogênio ou enxofre (AVERY e TOBIN, 1993).

A série de Irving-Williams é $[Mn(II) < Fe(II) < Co(II) < Ni(II) < Cu(II) > Zn(II)]$, é derivada das constantes de estabilidade dos metais de transição com ligantes de nitrogênio doadores e está freqüentemente relacionada com a adsorção de metais em microrganismos (AVERY e TOBIN, 1993). Logo, a constante de formação de complexos com cátions de metais de transição divalentes com ligantes doadores de nitrogênio aumenta de acordo com esta série (HUGUES e POOLE, 1991).

2.4.4.1.1.2 pH

BRADY e DUNCAN (1994) demonstraram que a captura de íons divalentes pela *S. cerevisiae* é significativamente reduzida abaixo do pH 5,0. Um baixo pH pode aumentar a mobilidade do metal, enquanto que em pHs próximos ou acima da neutralidade, existe a tendência de formação de óxidos insolúveis, hidróxidos e carbonatos.

Durante o processo de biosorção pode ocorrer uma mudança espontânea de pH, a qual afeta a captura do metal pelo microrganismo. O controle de pH necessário ou solução tampão pode afetar assim, a absorção. Os aditivos de controle do pH devem ser cuidadosamente selecionados, de forma que não interfiram na biosorção do metal (VOLESKY e MAY-PHILLIPS, 1995).

Em estudos realizados com a biomassa morta de *Rhizopus arrhizus*, a incorporação do zinco pela biomassa gerou uma diminuição do pH da solução externa. Estas mudanças de pH podem ser explicadas pelo fenômeno de troca iônica. Já que a superfície da célula do microrganismo é aniônica, ela está

provavelmente rodeada por íons de hidrogênio e, neste caso de ligação, estes são repostos por metais cátions, resultando na acidificação do meio externo (GADD e MOWLL, 1983).

2.4.4.1.1.3 Nitrogênio Orgânico

O extrato de levedura é rico em fonte de nitrogênio orgânico, e conseqüentemente, de aminoácidos. Entre os aminoácidos mais abundantes estão a treonina, a valina, a isoleucina, a fenilalanina, a tirosina e a lisina. A presença desta substância no meio de cultivo irá possibilitar um aumento na ligação do zinco com aminoácidos provenientes do extrato de levedura, influenciando diretamente no aumento da concentração do zinco orgânico (SANTUCCI et al., 2003).

Grupos enxofre são conhecidos como fortes ligantes de complexos de metais pesados, e a adição de cisteína ao meio de cultivo aumenta a capacidade de biosorção da biomassa de *S. cerevisiae* para alguns metais (ENGL e KUNZ, 1995).

2.4.4.1.2 A Biomassa de levedura como fonte de zinco orgânico

As leveduras estão recebendo maior atenção por parte dos pesquisadores devido aos benefícios nutricionais fornecidos aos animais e ser humano. A utilização da biomassa de levedura é bastante variada, podendo ser desde alguns de seus componentes até o seu aproveitamento integral, sendo que para isso, diferentes técnicas podem ser empregadas. O concentrado protéico e a levedura seca são as duas principais formas de aplicação da biomassa.

Sendo assim, as leveduras, crescendo em meio contendo uma elevada quantidade de cátions metálicos, podem acumular esses metais em suas células (VOLESKY, 1990). Esse fenômeno pode ser utilizado na preparação de ingredientes de alimentos pobres em micronutrientes (HALÁSZ e LASZITTY, 1991).

Devido à sua habilidade em incorporar metais em sua célula, o uso da biomassa de levedura está aumentando muito como um veículo de entrega de metais em uma série de suplementos. O enriquecimento de metais em leveduras é obtido pela inclusão de um sal inorgânico do metal desejado no meio de cultivo,

seguido por um processo de aquecimento para cessar o crescimento do microrganismo e inibir sua atividade enzimática. O metal é incorporado às leveduras por uma série de vias, incluindo a produção de metaloproteínas (inclusive as metalotioneínas), mineralização e o seqüestro por vacúolos (SHOEIB e MESTER, 2007).

Entre as espécies de leveduras citadas pela literatura como bioacumuladoras de metais estão *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Candida spp* (MALIK, 2004).

Vários subprodutos da indústria de alimentos e da agricultura têm sido propostos na produção de biomassa de levedura com grau alimentício. Espécies como a *Candida*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, sozinhas ou em culturas mistas com outras leveduras, têm sido cultivadas em águas residuais de processo, hidrolisados e polpas, em resíduos lácteos, em resíduos da indústria sucroalcooleira e da pesca (BEKATOROU et al., 2006).

O zinco ligado a leveduras é muito usado em dietas de animais e humanos em países pobres. As culturas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis* são freqüentemente usadas na alimentação de gado, especialmente se enriquecidas com zinco, selênio, cromo e magnésio (DOBRANSKI et al., 2003).

2.4.4.1.2.1 Aspectos nutricionais

A biomassa de levedura pode ser usada na alimentação humana e animal, sob várias formas. Ela apresenta elevado valor nutritivo e baixo custo de produção (ALVIM et al., 2002). Ela pode ser consumida diretamente como alimento ou aditivo de alimentos, pois é composta de 45 a 65% de proteína, sendo considerada uma boa fonte protéica não-convencional (PACHECO, 1996a; SGARBIERI et al., 1999).

Apesar disso, existem alguns fatores que limitam sua utilização em alimentos para humanos como a indigestibilidade da parede celular, o que reduz a biodisponibilidade das proteínas; e o elevado teor de ácidos nucléicos, principalmente RNA, indesejável para o consumo humano (PACHECO, 1996a; ASSIS, 1996; VILELA et al., 2000). Por estas razões, é importante o desenvolvimento de métodos de processamento da biomassa, os quais permitam minimizar os problemas mencionados.

A composição aminoacídica da proteína de levedura pode ser utilizada como um parâmetro inicial para avaliação do valor nutricional das proteínas em geral. A proteína é considerada de bom valor nutricional quando sua composição de aminoácidos essenciais apresenta-se na quantidade adequada e equilibrada. Sua composição deve se aproximar dos valores recomendados pelo padrão de referência da *Food and Agriculture Organization/World Health Organization*/Organização das Nações Unidas (FAO/WHO/ONU, 1985; HENLEY e KUSTER, 1994). A composição aminoacídica da proteína de levedura é bem balanceada, como pode ser observado na tabela 5.

TABELA 5 – COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS DA CÉLULA ÍNTEGRA DE LEVEDURA DE CERVEJA, COMPARADO AO ISOLADO PROTÉICO DE SOJA E PADRÃO DE REFERÊNCIA DA FAO/WHO/ONU.

Aminoácidos (g/100g Proteína)	Levedura de Cerveja*	Isolado Protéico de Soja**	Padrão Referência***
Isoleucina	5,3	4,9	2,8
Leucina	7,8	8,2	6,6
Lisina	7,8	6,3	5,8
Metionina + Cistina	2,5	2,6	2,5
Fenilalanina + Tirosina	8,8	9,0	6,3
Treonina	5,4	3,8	3,4
Triptofano	1,3	1,3	1,1
Valina	5,8	5,0	3,4
Histidina	2,0	2,6	1,9

* PACHECO, 1996a

** HENLEY e KUSTER, 1994

*** FAO/WHO/ONU, 1985

Destaca-se o fato de as leveduras apresentarem alto teor de lisina e leucina, e teores adequados de treonina e triptofano. Embora o perfil aminoacídico não seja comparável a proteínas de origem animal, ele se iguala as melhores proteínas de origem vegetal como a soja (PACHECO, 1996b). Segundo VILELA et al. (2000), de todas as leveduras, a do gênero *Saccharomyces* é a de maior valor industrial e comercial, devido ao seu alto teor de lisina.

Os carboidratos representam 45 a 55% do peso da levedura, sendo representados em média por 33% de trealose, 27% de glucanos, 21% de mananas e 12% de glicogênio. As suplementações com minerais no início da fermentação alcoólica podem alterar significativamente a composição em minerais da levedura

seca. Embora as leveduras sejam pesquisadas como fonte de proteína, ela pode ser usada também como suplemento vitamínico, sendo fontes ricas das vitaminas do complexo B e de ergosterol, o que a torna uma fonte de vitamina D (BUTOLO, 1996).

2.4.4.1.2.2 Aspectos Industriais

O uso de leveduras na produção de proteínas é bastante difundido, pois estas podem ser facilmente cultivadas, utilizando matérias primas baratas, e semeadas, já que possuem células de tamanho maior e a habilidade de floculação. Além disso, contêm menores quantidades de ácidos nucleicos do que as bactérias (BEKATOROU et al., 2006).

Segundo VILELA et al. (2000), foi demonstrado que isolados protéicos obtidos a partir de células de levedura podem ter melhor qualidade nutricional do que as células íntegras. Estas últimas têm como desvantagem o seu conteúdo maior de ácidos nucleicos, a presença de componentes ativos indesejáveis, e o efeito deletério da parede celular sobre a biodisponibilidade de nutrientes.

Para a extração da proteína intracelular faz-se necessário o rompimento da parede, um invólucro resistente, que representa aproximadamente 30% do peso seco. Os métodos mais utilizados para o rompimento celular são:

- Tratamento enzimático: lise enzimática ou inibição da síntese da parede celular;
- Tratamento químico: álcalis, solventes, detergentes, ácidos;
- Tratamento não mecânico ou físico: choque osmótico, congelamento e descongelamento, aquecimento, secagem;
- Tratamento mecânico: homogeneizador de alta pressão, moinho de bolas, prensa francesa e ultra-som. (PESSOA JÚNIOR e KILIKIAN, 2005).

Quando a parede é tratada com um álcali fraco ou certas enzimas digestivas, são obtidas frações macromoleculares e fragmentos da parede celular. No caso de hidrólise com ácidos fortes, são obtidos glicose, manose, glucosamina, aminoácidos, fosfatos e lipídios (ASSIS, 1996).

O conteúdo de ácidos nucleicos é elevado tanto na biomassa como na proteína concentrada. A proteína de levedura concentrada sem o uso de reagentes químicos ou tratamento enzimático apresenta-se complexada com o ácido ribonucleico (RNA) que se precipita junto à proteína, compondo cerca de 15% da célula (PACHECO, 1996a).

A preocupação em reduzir o conteúdo de RNA se deve ao fato de que primatas superiores e humanos não possuem a enzima uricase que degrada o ácido úrico, produto final do metabolismo dos ácidos nucleicos, especialmente do RNA, e que pode gerar distúrbios metabólicos (PACHECO, 1996a). A ingestão de células de leveduras acima de 30 g, ou de ácidos nucleicos acima de 2 g/dia, por humanos, pode elevar exageradamente a concentração de uratos no sangue e nos tecidos, resultando em cálculos renais e/ou gota (SGARBIERI et al., 1999).

2.4.4.1.3 Utilização da levedura na alimentação animal

A especificação de levedura seca para ração animal possui como requisitos de qualidade os seguintes pontos: umidade máxima (8,0%), proteína bruta mínima (35 a 40%), cor (consistente-clara), pH (maior que 5,0), sabor (característico – acidez), cheiro (característico). Além disso, deve ser isenta de aflatoxinas e carunchos, ter granulometria de 30 mesh, e ser embalada em polietileno com duas camadas de papel kraft (LEIMER, 2005).

Um dos grandes benefícios dos minerais orgânicos está relacionado a sua maior biodisponibilidade. A biodisponibilidade do mineral, ou seja, a fração do mineral que realmente é absorvida e utilizada pelo animal, varia de acordo com o tipo da fonte mineral e também entre as diferentes espécies animais.

O fato de os minerais orgânicos não interagirem com outros minerais e sofrerem menor influência dentro do trato digestivo, os coloca em vantagem frente às fontes de minerais convencionais, na forma de sais inorgânicos. Ligados a uma molécula orgânica, normalmente aminoácidos ou peptídeos, os minerais orgânicos usam as vias de absorção dessas moléculas. Isto faz com que eles não tenham problemas de interações com outros minerais (MCDOWELL, 1992).

Nos mamíferos, a absorção de zinco ocorre em uma pequena porção do intestino através de dois mecanismos: transporte ativo e passivo. O transporte ativo é saturável em altas concentrações do metal no lúmen do intestino, e sua eficiência aumenta durante períodos de baixa digestão. Ao contrário, o transporte passivo é um mecanismo de difusão, o qual é inalterável durante o período de baixa ingestão e sua eficiência é proporcional à concentração de zinco no lúmen. Existem muitos fatores que podem modificar a absorção de zinco, e eles podem ser considerados como ativadores (ácido picolínico, vitamina B₆, citrato, aminoácidos) ou inibidores (ácidos oxálico e fítico, fibras, selênio, ferro, cálcio) deste processo (MCDOWELL, 1992).

Na forma orgânica, o zinco está protegido do ácido clorídrico liberado no estômago, e passa para o duodeno, onde é facilmente absorvido pelas células da mucosa, carregadas negativamente. Os receptores de absorção de aminoácidos circundam as microvilosidades intestinais. Esses receptores são células altamente capazes de absorver aminoácidos e estão largamente distribuídos através das paredes da mucosa duodenal. Os aminoácidos ou complexos são absorvidos quase que prontamente. A forma orgânica aumenta a absorção global destes nutrientes vitais na corrente sanguínea, tornando-os altamente biodisponíveis às necessidades orgânicas e funcionais (MCDOWELL, 1992).

SPEARS (1989) relatou que não encontrou nenhuma diferença no crescimento de novilhos recebendo óxido de zinco e o quelato de zinco com metionina, embora houvesse a tendência a uma melhor resposta nesse último tratamento. Porém em outro estudo, SPEARS et al. (1991) perceberam que o peso corporal de bezerros desmamados foi mais alto para os bezerros suplementados com zinco metionina do que o de bezerros controle e o de bezerros que recebiam óxido de zinco.

KESSLER et al. (2003) demonstraram em um estudo com vacas em crescimento que, com a suplementação de zinco metionina, o desenvolvimento dos animais melhorou consideravelmente, quando comparado com os tratamentos realizados com o óxido de zinco. As melhoras percebidas nos animais destacam o ganho de peso e a razão de conversão de alimentação nos primeiros 56 dias do teste. Eles também observaram que, durante o período de 126 dias do experimento completo, diferenças estatísticas aconteceram. Assim também, novilhos - em crescimento e em período final de crescimento - suplementados com proteinato de

zinco, quando comparados com a suplementação com óxido de zinco, tenderam a crescer mais rápido e a ingerir mais ração.

A adição do zinco orgânico em dietas de bovinos aumentou o crescimento (SPEARS, 1996), melhorou as características da carcaça (SPEARS e KEGLEY, 2002) e as medidas da qualidade de cascos (KESSLER et al., 2003), quando comparada com dados observados em animais tratados com uma dieta suplementada com zinco inorgânico.

Também foi observada uma maior absorção de zinco ligado a metionina, quando comparada com a absorção de zinco inorgânico, de cerca de três vezes maior, na alimentação de peixes (PARIPATANANONT e LOVELL, 1995).

2.4.4.2 Produção de suplementos alimentares de zinco orgânico utilizando outros processos

Além da produção de metais orgânicos através da adição de sais do metal de interesse ao meio de cultivo durante a fermentação líquida do microrganismo, existem outras duas formas de fabricação deste produto, a biosorção utilizando biomassa morta e a síntese química.

A biosorção é o processo que utiliza biomassa morta de baixo custo para seqüestrar metais, e é particularmente útil na remoção de contaminantes de efluentes industriais. Os biosorventes são preparados a partir de biomassa morta abundante de algas, leveduras, fungos e bactérias, que por sua vez é pré-tratada através de lavagem com ácidos e/ou bases antes da secagem e granulação final. Apesar da moagem da biomassa seca poder render partículas biosorventes estáveis, alguns tipos de biomassa são imobilizados em uma matriz sintética polimérica, e/ou são aplicadas em um material inorgânico de suporte, como a sílica, de forma a formar partículas com as propriedades mecânicas necessárias (KRATOCHVIL e VOLESKY, 1998).

O processo de síntese química pode ser utilizado tanto na produção de quelatos, como também na de complexos. Entre os dois produtos, o que possui maior destaque comercial são os quelatos.

A produção de minerais quelatos utilizando processos físico-químicos é conhecida como quelação. O quelato refere-se a um tipo especial de complexo formado entre o ligante e o íon de metal. Para ser classificado como quelante, o ligante ou agente quelante deve: 1) conter um mínimo de dois grupos funcionais (oxigênio, nitrogênio, amino, hidroxila) cada um capaz de doar um par de elétrons para combinar (via ligação covalente coordenada com um metal) e 2) formar uma estrutura de anel heterocíclico com o metal (SPEARS, 1996).

Os quelatos de minerais, para serem assim chamados, devem estar fundamentados em alguns pontos:

- *Tamanho*: o tamanho do quelato deve ser pequeno o bastante para que os minerais com suas moléculas carregadoras possam ser absorvidos sem sofrerem qualquer digestão. A molécula resultante deve ter um peso molecular inferior a 1500 Dalton para que o quelato possa ser absorvido intacto.
- *Estabilidade*: devem ser compostos minerais estáveis, além disso, devem ser menos vulneráveis as interações minerais adversas que ocorrem no aparelho digestivo. A elevada estabilidade de um quelato, adquirida por meio de eficientes processos de fabricação, assegura que o quelato não se rompa no estômago, não liberando o metal.
- *Neutralidade*: o composto final não deve possuir carga elétrica. Com isto, o quelato pode ser absorvido no trato digestivo do animal na forma original, além de não sofrer possíveis interferências dos demais componentes da dieta, que o tornaria insolúvel (BARUSELLI, 2005).

Este processo inicia-se com o isolamento da proteína proveniente da levedura, uma vez que a levedura apresenta em torno de 40% de material protéico. Esta biomassa de levedura é um resíduo da indústria sucroalcooleira. Depois que a proteína é separada, ela passa por um processo de hidrólise, através da quebra pela água, que tem por objetivo romper a cadeia de aminoácidos presentes na sua molécula. A hidrólise é feita por meio de reações químicas e enzimáticas. Após esta etapa, ocorre a separação dos aminoácidos obtidos, através do processo industrial de cromatografia.

Com a obtenção da solução do aminoácido específico, passa-se para a etapa da quelação. Para que ela ocorra, o mineral necessita ser ionizado e colocado em solução com o aminoácido desejado. Este processo pode levar de 2 a 18 horas, de modo que ocorram as ligações químicas entre o cátion metálico e o ligante, que é o aminoácido. As soluções são devidamente aquecidas ou resfriadas, com agitação contínua para assegurar que os componentes não precipitem a solução antes que a quelação ocorra. O pH é monitorado cuidadosamente, já que a intenção é que o quelato não seja hidrolisado no ambiente ácido do estômago, e sim direcionado ao pH alcalino do intestino, e após isto, para a mucosa do jejuno. Depois de determinado período, a suspensão é centrifugada, e o precipitado é seco em *Spray Dryer*.

2.4.5 Determinação do Zinco Orgânico

Apesar de a AAFCO definir especificamente os conceitos dos complexos e dos quelatos, nem ela, nem a AOAC possuem métodos definidos para testar o grau de quelação ou complexação dos minerais com ligantes orgânicos em amostras comerciais (GUO et al., 2001). A falta de um método padrão para a determinação da associação entre o mineral e o ligante orgânico torna difícil para os produtores de animais a escolha da fonte de mineral traço orgânico que possua maior biodisponibilidade. SPEARS et al. (1991) revisaram a metodologia analítica utilizada no teste de fontes orgânicas de metais. Porém nenhum destes métodos media a associação entre o mineral traço e o ligante.

LEACH e PATTON (1997) sugeriram uma metodologia de análise para a avaliação de minerais quelados. Ele consiste na adição do suplemento mineral em água, em seguida a filtração da suspensão. O filtrado resultante é analisado em um eletrodo, para a quantificação da forma lábil do mineral; em um espectrofotômetro, para a determinação da quantidade total do metal; e pelo método Kjeldahl, para a quantificação das proteínas. Já o precipitado é avaliado com relação a porcentagem do mineral estudado e de proteínas ali presentes.

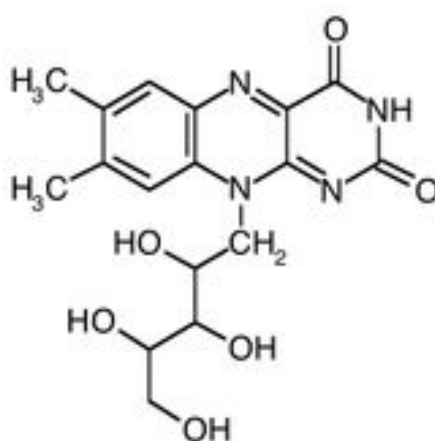
Outros métodos citados pela literatura utilizam como tecnologia de apoio o potenciômetro, a cristalografia de raio-X, a absorção UV, e a cromatografia (LEACH e PATTON, 1997).

As concentrações do mineral livre, do ligante livre, e do mineral ligado organicamente podem ser usadas para calcular a estabilidade do mineral orgânico. Quanto mais a estabilidade aumenta, maior afinidade do ligante pelo metal. O ligante com a maior afinidade irá se ligar a grande parte do metal (PARKS e HARMSTON, 1994).

2.5 PRODUÇÃO DE VITAMINA B₂

A riboflavina ou vitamina B₂ é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo B₂, apresenta coloração amarela e é fluorescente (DE SOUZA et al., 2005). Seu consumo mundial é de aproximadamente 1250 toneladas ao ano. De acordo com a fonte de onde é extraída, ela poderá ter várias denominações, como: lactoflavina, ovoflavina, hepatoflavina. Suas principais fontes na alimentação são carnes, ovos, pescados e leite, além de estar em alta concentração nas leveduras (PESSOA et al., 2003) (ver figura 6).

FIGURA 6 – ESTRUTURA DA VITAMINA B₂



FONTE: WIKIPEDIA, 2007b.

A dose recomendada de ingestão de riboflavina varia de 0,4 mg, na infância, a 1,3 mg/dia, na fase adulta. Para mulheres grávidas, recomenda-se uma dose

suplementar de 0,3 mg/dia durante a gestação, e 0,5 mg/dia durante o período de lactação (DE SOUZA et al., 2005). A deficiência de riboflavina é caracterizada por inflamação da língua e da boca. Em casos mais graves, por perturbações do aparelho digestivo (DUTRA-DE-OLIVEIRA e MARCHINI, 1998; ACCIOLY et al., 2002).

A riboflavina é de fundamental importância em organismos aeróbios, sendo precursora de importantes coenzimas participantes da cadeia transportadora de elétrons. Ela também dá origem a muitas flavinas que se encontram ligadas a diversas enzimas, as quais atuam na catálise de um grande número de importantes reações, como por exemplo, as relacionadas ao reparo do DNA (DE SOUZA et al., 2005). Além disso, atua na formação de hemácias, na regulação de enzimas tireoidianas e tem importante atuação na neoglicogênese (DUTRA-DE-OLIVEIRA e MARCHINI, 1998; ACCIOLY et al., 2002).

A vitamina B₂ é bastante estável à ação do ar, calor e oxigênio; porém quando exposta à luz e em soluções alcalinas, sofre clivagem na molécula de ribitol, com formação de lumilactoflavina. É por esta razão que o leite, quando em recipientes de vidro e exposto ao sol, perde até 85% do seu teor de riboflavina (BOBBIO e BOBBIO, 2003).

Essa vitamina é comercialmente produzida por síntese química e por fermentação microbiana, sendo a última preferida, pois tem propiciado o desenvolvimento de novas tecnologias, juntamente com a diminuição de custos e a alta produtividade. Além disso, a riboflavina é a única vitamina que é rápida e totalmente sintetizada em altas concentrações por microrganismos (PESSOA et al., 2003). CRUEGER e CRUEGER (1989) calcularam que 20% da vitamina B₂ são obtidas por síntese total, 50% por processo misto e 30% por fermentação exclusiva.

SABRY et al. (1989) afirmaram que a *Candida guilliermondii* Wickerham é o melhor produtor de vitamina B₂, e que utiliza a energia solar como única fonte de carbono. A *P. guilliermondii* forma a riboflavina tendo hidrocarbonetos alifáticos como fonte de carbono (entre C₁₀ e C₁₈), dando um rendimento elevado deste produto (LIMA et al., 2001).

O uso de meios completamente sintéticos é inadequado para a produção da riboflavina através das leveduras (OSMAN e SHAHEEN, 1966). Substâncias naturais como extrato de levedura, e melaço concentrado de milho, são conhecidas

como estimulantes para tanto o crescimento celular, como também para flavinogênese (RAGAB, 1968). Da mesma forma, íons metálicos, óleos, ácidos graxos, aminoácidos e vitaminas influenciam a produtividade da riboflavina de diferentes formas (OLCZYK, 1978; KELLER et al., 1983).

2.6 VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS E AGROINDUSTRIAIS

Ao longo dos séculos 20 e 21, um número considerável de processos fermentativos industriais foi introduzido ou aperfeiçoado aproveitando o potencial de matérias-primas renováveis na obtenção de produtos químicos, combustíveis, alimentos e bebidas, bioinseticidas, fármacos e enzimas, entre outros. Dentre essas matérias-primas, os resíduos agrícolas e agroindustriais desempenham um papel marcante, com uma gama de processos fermentativos sendo realizados com base em materiais como caldo e melaço de cana-de-açúcar, farelos de soja, trigo e arroz, resíduos celulósicos e da indústria de papel (SERAFINI et al., 2002).

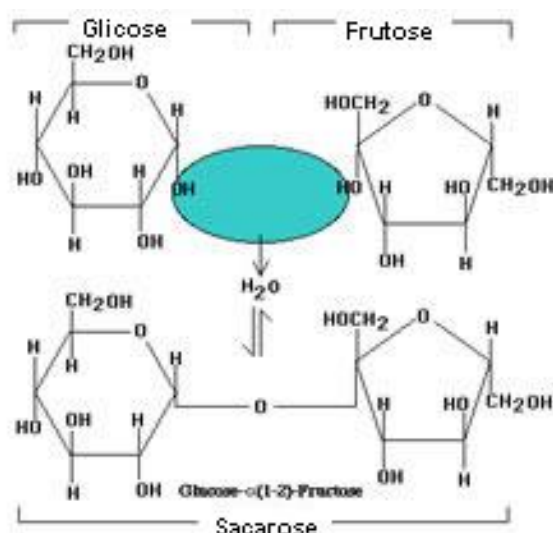
2.6.1 A Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar, a matéria prima mais antiga do Brasil, traz inúmeros benefícios para a economia do país, gerando açúcar, álcool anidro (aditivo para a gasolina) e álcool hidratado para os mercados interno e externo. Colabora ainda na produção de alimentos, papel, plásticos, produtos químicos, além de fornecer energia elétrica. O processamento da cana-de-açúcar é focado na produção do açúcar (sacarose). Outros produtos do processamento incluem o bagaço, o melaço e o bolo de filtração (UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO, 2007).

O melaço da cana-de-açúcar é o licor resultante da cristalização final do açúcar, do qual não pode ser extraída mais o açúcar sacarose pelos métodos convencionais. Aproximadamente 60% dos sólidos são compostos por sacarose, glicose e frutose (ver figura 7). Sua composição é muito variável, pois depende de fatores agrícolas e industriais, como a variedade da cana-de-açúcar, o grau de

maturação, clima, condições de cultura, tipo de corte, e eficiência industrial, entre outros (ICIDCA, 1999).

FIGURA 7 – MOLÉCULAS DOS AÇÚCARES GLICOSE, FRUTOSE E SACAROSE



FONTE: HAEGENS, 2007.

Os principais componentes do melaço são a água e os carboidratos, além de compostos não-açúcares de origem orgânica como: aminoácidos, ácidos carboxílicos alifáticos e olefínicos, vitaminas, proteínas, fenóis e outros. O melaço de cana-de-açúcar é constituído por uma fração de origem mineral de grande importância, na qual estão presentes mais de 20 metais e não-metais em diferentes proporções. Entre os cátions encontrados, o potássio, o cálcio e o magnésio ocupam mais que 98% do total (ICIDCA, 1999).

Do nitrogênio presente no melaço somente 35% são assimilados, na forma de proteína pura, contando com um adicional de 7% de componentes nitrogenados na forma de ácidos nucléicos, aminoácidos livres e outros compostos. A composição de aminoácidos no melaço é de 1%, entre os quais se destacam os ácidos aspártico e glutâmico, que constituem mais de 70% do total (ICIDCA, 1999).

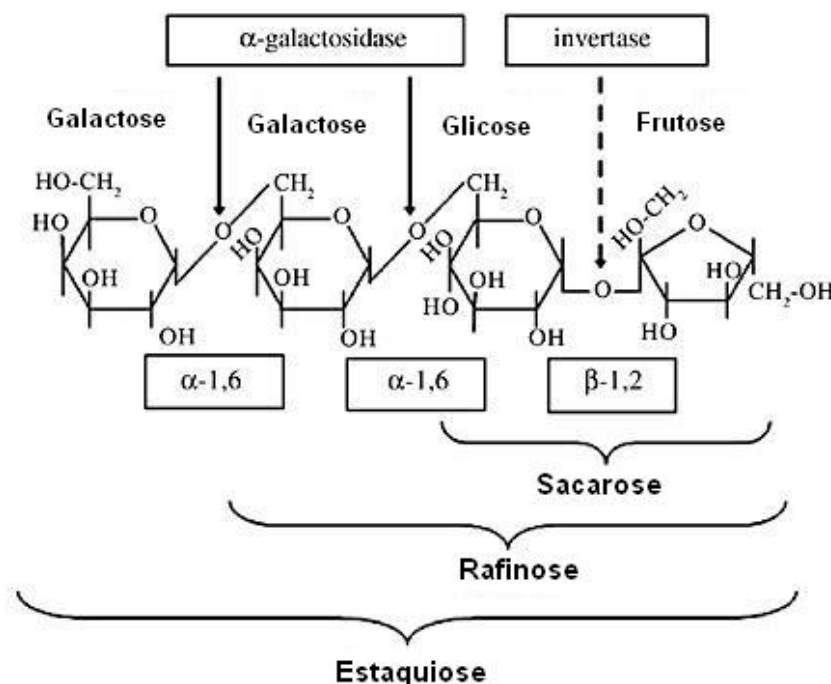
2.6.2 A Soja

A soja é uma das principais fontes vegetais de óleo comestível, além de ser fonte de proteína para a alimentação. O grão da soja contém cerca de 40% de proteína, 20% de gordura, 5% de cinzas e 35% de carboidratos, em base seca. No Oriente, a soja é utilizada como uma fonte importante de proteína na alimentação humana por milhares de anos. No Ocidente, em contrapartida, a maioria dos grãos desta oleaginosa é processada em óleo, enquanto que o farelo de soja com alto valor protéico é utilizado principalmente em rações animais com alto teor de proteína e apenas em pequena extensão na alimentação humana. Entretanto, nas últimas décadas, a importância da soja como uma fonte para as necessidades humanas de proteína tem aumentado significativamente nos mercados ocidentais.

O melaço da soja é um material de baixo custo, que gera problemas ambientais de acúmulo de resíduos, e assim é utilizado principalmente como um ingrediente de baixo custo de nutrição animal. É obtido como um subproduto do processo de fabricação do concentrado protéico de soja, e provém do produto do extrato aquo-alcóolico obtido após a remoção do álcool e parte da água presente (CEGLA e SHUSTER, 2005).

Os principais constituintes do melaço de soja - os açúcares da soja - consistem em cerca de 65% de mono e dissacarídeos e cerca de 35% de oligossacarídeos, principalmente, a rafinose (5-7%) e estaquiose (30-32%), que podem ser observados na figura 8.

FIGURA 8 – MOLÉCULAS DOS AÇÚCARES SACAROSE, RAFINOSE E ESTAQUIOSE



FONTE: FUNPECRP, 2007.

Os oligossacarídeos da soja não podem ser digeridos pelos humanos e animais monogástricos, e são a principal causa de flatulência e desconforto gerados pela ingestão da soja. Entretanto, os oligossacarídeos da soja são utilizados como agentes estimulantes de crescimento de bifidobactérias (que são usadas como prebióticos), que possuem alta importância devido a seus efeitos benéficos. Os oligossacarídeos da soja também podem ser utilizados como aditivos adoçantes de baixo valor calórico em alimentos (CEGLA e SHUSTER, 2005).

2.7 PLANIFICAÇÃO EXPERIMENTAL

Um dos problemas mais comuns para quem faz experimentos é determinar a influência de uma ou mais variáveis sobre uma outra variável de interesse. No planejamento de qualquer experimento, a primeira coisa que se deve fazer é decidir quais são os fatores e as respostas de interesse. Os fatores, em geral, são as variáveis que o experimentador tem condições de controlar. As respostas são as

variáveis de saída do sistema, nas quais se tem interesse, e que serão – ou não – afetadas por modificações provocadas nos fatores (DEMAIN e DAVIES, 1999).

O planejamento dos experimentos, ou, a especificação detalhada de todas as operações experimentais que devem ser realizadas vai depender do objetivo particular que se quer atingir. Objetivos diferentes precisarão de planejamentos diferentes (NETO et al., 2003).

Os planejamentos fatoriais de dois níveis são úteis em investigações preliminares, quando se deseja saber se determinados fatores têm ou não influência sobre a resposta, e ainda não existe a preocupação em descrever muito rigorosamente essa possível influência. São planejamentos muito simples de executar, que depois podem ser ampliados para formar um planejamento mais sofisticado (NETO et al., 2003; DEMAIN e DAVIES, 1999).

Se existe um número de fatores relativamente grande, é possível que alguns deles não tenham influência significativa sobre a resposta. Nesse caso, um planejamento completo seria um desperdício. O melhor seria fazer uma triagem, para decidir quais são os fatores que merecem um estudo mais aprofundado. Para isso, pode-se utilizar um planejamento fatorial incompleto, como fatorial fracionário (NETO et al., 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Processos Biotecnológicos da Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Federal do Paraná.

3.1 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas nos experimentos as cepas de leveduras abaixo relacionadas. Elas foram obtidas no banco de cepas NRRL (localizado nos Estados Unidos).

- *Sacharomyces cerevisiae* NRRL YB 2293
- *Sacharomyces cerevisiae* NRRL Y 2034
- *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y 8281
- *Komagataella (Pichia) pastoris* NRRL Y 1603
- *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063

3.2 MELAÇO DE SOJA E MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Foram escolhidos dois resíduos industriais para serem testados com fonte de carbono nos experimentos, por serem estas fontes de açúcares metabolizados por leveduras. O melaço de cana-de-açúcar é constituído principalmente por glicose, frutose e sacarose. Já o melaço de soja tem como composição 65% de mono e dissacarídeos, e cerca de 35% de oligossacarídeos (rafinose e estaquiose).

O melaço de soja utilizado neste trabalho foi obtido através de doação da empresa Imcopa, localizada na cidade de Araucária, Paraná. Já o melaço de cana-de-açúcar aplicado nos testes foi proveniente da empresa Ouro Fino, estabelecida na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo.

3.3 MEIOS DE CULTIVO

3.3.1 Meio Yeast Medium (YM) Líquido

O meio YM líquido possui a seguinte composição: Extrato de Levedura, 3 g/L; Extrato de Malte, 3 g/L; Peptona, 5 g/L; Glicose, 10 g/L; Água, qsp.

3.3.2 Meio YM Sólido

O meio YM sólido é composto pelos seguintes ingredientes: Extrato de Levedura, 3 g/L; Extrato de Malte, 3 g/L; Peptona, 5 g/L; Glicose, 10 g/L; Ágar, 20 g/L; Água, qsp.

3.4 MANUTENÇÃO DAS CEPAS

As cepas das leveduras liofilizadas foram reativadas por suspensão em 0,5 mL de meio de cultivo YM líquido esterilizado e incubadas em tubos contendo 10 mL de meio YM sólido na posição inclinada, a 30 °C por 72 horas. Após este período, os tubos foram mantidos sob refrigeração a 4 °C por, no máximo, 3 meses.

3.5 PREPARO DO INÓCULO

Procedeu-se a transferência de uma alçada de células contidas em um tubo inclinado para um Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL do meio YM líquido. O frasco foi incubado sob agitação em incubador do tipo *Shaker* a 30 °C e 120 rpm durante 24 horas, ou até obter-se uma concentração de células da ordem de 1×10^7 a 1×10^8 células/mL. A contagem das células foi realizada utilizando o método descrito no item 3.14.2.1.

3.6 FLUXOGRAMA DO PROCESSO

A Figura 9 ilustra o fluxograma do bioprocesso de produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico em escala laboratorial, realizado durante os testes em frascos Erlenmeyer de 250 mL, com agitação em agitador do tipo *Shaker* e em Fermentador com capacidade de 2 L.

Os ingredientes do meio de cultivo a serem utilizados foram pesados em balança semi-analítica, e adicionados à água destilada. Os tipos de ingredientes e suas concentrações variaram conforme o teste a ser realizado (ver itens 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, e 3.13). Os meios de cultivo foram acondicionados em Erlenmeyers de 250 mL contendo cada 100 mL do meio, ou em fermentador com capacidade de 2 L, contendo 1,5 L de meio. Em seguida, os frascos ou o fermentador sofreram tratamento térmico em autoclave a 105 °C por 15 minutos.

As soluções concentradas de ZnSO_4 e MgSO_4 foram preparadas separadamente, para evitar que os metais se complexassem com alguma substância do meio de cultivo durante o tratamento térmico. A concentração desta solução variou de 1 a 10%, de acordo com a concentração do metal a ser adicionada no meio de cultivo. A adição das soluções ao meio de cultivo foi realizada assepticamente em câmara de fluxo laminar.

O preparo do inóculo foi realizado de acordo com o item 3.5. A adição do inóculo das cepas de levedura no meio de cultivo também foi em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar.

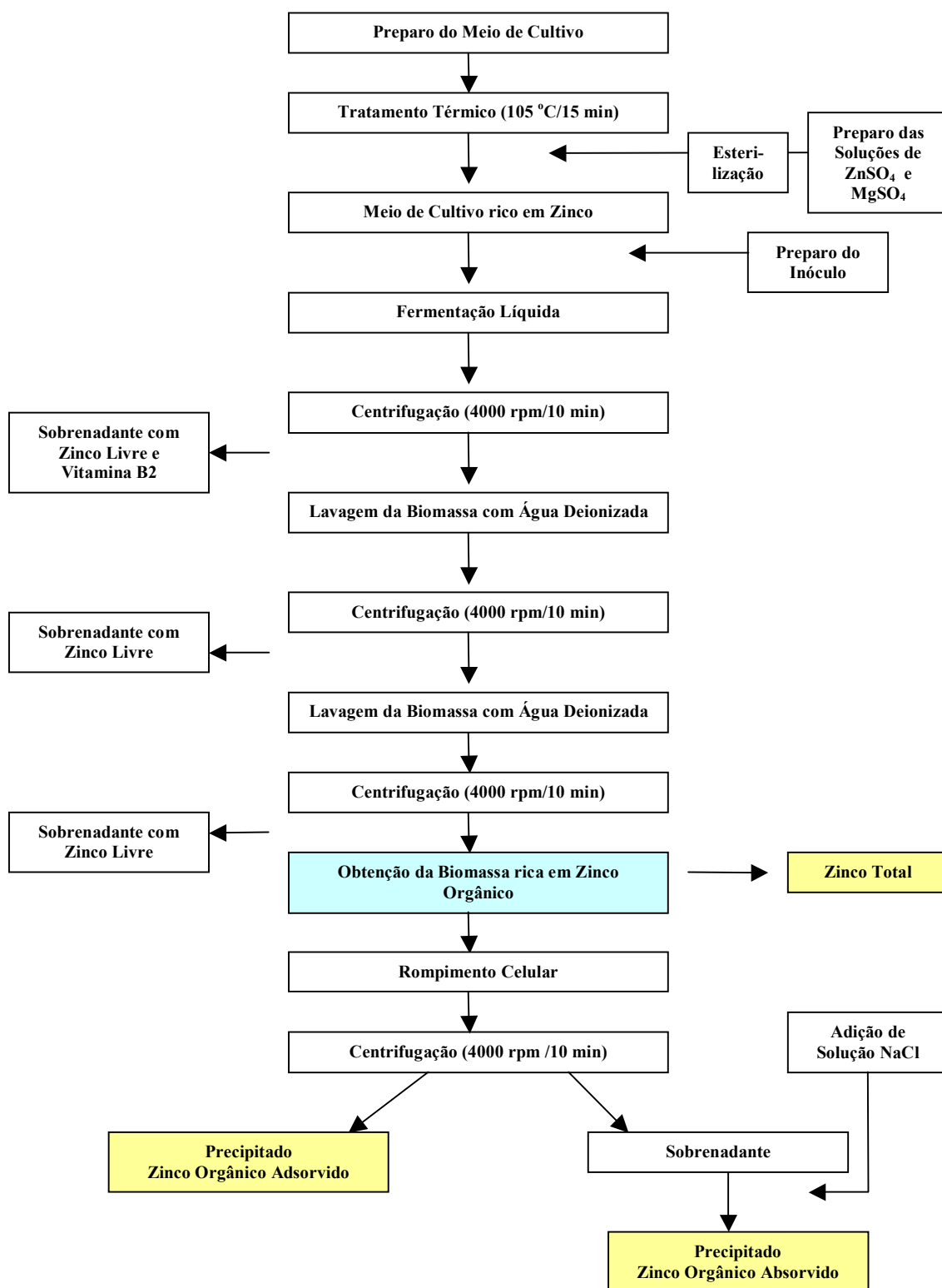
Deu-se então prosseguimento à fermentação líquida, cujas condições variaram, conforme descrito nos itens 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, e 3.13.

Após o processo de cultivo da biomassa enriquecida com zinco, o meio de cultivo foi centrifugado a 4000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante contendo zinco livre e a vitamina B2 foi desprezado, e a biomassa restante foi lavada com água deionizada. A mistura foi submetida novamente à centrifugação a 4000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante contendo zinco livre foi novamente desprezado. Este procedimento foi realizado novamente.

A biomassa de levedura obtida foi avaliada com relação à concentração de zinco total nos itens 3.7, 3.8, 3.9, e 3.10.

A metodologia de rompimento celular foi testada conforme descrito no item 3.11.1, e depois de definido o melhor procedimento para este fim, a metodologia para a separação do Zinco Orgânico Adsorvido, Zinco Orgânico Absorvido e Zinco Livre foi estabelecida, conforme o item 3.11.2.

FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA ENRIQUECIDA COM ZINCO ORGÂNICO



3.7 SELEÇÃO DAS CEPAS

Neste estudo foram realizados experimentos com o intuito de selecionar cepas de microrganismos capazes de produzir uma alta quantidade de biomassa, além de acumular uma grande concentração de zinco nesta biomassa formada.

O cultivo de SCP em meio com zinco utilizando leveduras foi escolhido, pois as leveduras possuem, do ponto de vista tecnológico, vantagens em relação a outros microrganismos, principalmente em razão da sua capacidade de assimilar grande variedade de substratos, de suas altas velocidades de crescimento e da facilidade de separação de sua biomassa (ICIDCA, 1999). Além disso, elas são citadas na literatura por sua habilidade em acumular metais em suas células, quando em crescimento em um meio contendo uma elevada quantidade de cátions metálicos (VOLESKY, 1990).

Foram testadas neste experimento cinco cepas de leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Pichia*, que foram escolhidas por terem sido mencionadas na literatura como produtoras de SCP para consumo humano e animal (BEKATOROU et al., 2006).

O meio de cultivo utilizado em todos os testes foi o seguinte: Melaço de cana-de-açúcar, 5°Brix; Extrato de Levedura, 10 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L; KH_2PO_4 , 5 g/L; MgSO_4 , 0,5 g/L. Este meio foi elaborado com base nos experimentos realizados com *Saccharomyces cerevisiae* em meio rico em zinco desenvolvido por STEHLIK-THOMAS et al.(2004). O volume final dos experimentos foi de 100 mL, adicionado em frascos Erlenmeyer de 250 mL e estes cobertos com tampão de algodão permeável ao oxigênio. A esterilização do meio foi realizada conforme o item 3.6.

O inóculo foi preparado conforme o item 3.5. A quantidade de inóculo adicionada foi de 10% referente ao volume total. O preparo das soluções de ZnSO_4 e MgSO_4 e a adição das mesmas e do inóculo ao meio de cultivo é descrito no item 3.6. As concentrações de ZnSO_4 adicionadas ao meio de cultivo foram de 0,05; 0,1; 0,2 e 0,5 g/L. Nos estudos realizados por STEHLIK-THOMAS et al. (2004), a concentração de ZnSO_4 foi fixada em 0,1 g/L, porém como neste experimento vários gêneros de leveduras foram utilizados (*Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Pichia*), decidiu-se utilizar várias concentrações do sal.

Os testes foram realizados em agitador do tipo *Shaker* (ver figura 10) e em duplicata. As condições físicas utilizadas foram: temperatura, 30 °C; pH inicial, 6,0; agitação, 120 rpm; tempo de cultivo, 120 horas.

Foram avaliadas as biomassas obtidas em relação ao teor de zinco presente no tempo de 120 horas de cultivo, conforme o item 3.14.1.3, e em relação ao peso seco obtido nas mesmas condições nos tempos de cultivo de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas, conforme o item 3.14.1.5. Além disso, foi realizada a análise de açúcares totais no sobrenadante obtido durante o cultivo nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas, conforme o item 3.14.1.2.

FIGURA 10 – CULTIVO EM FRASCOS ERLLENMEYER COM AGITAÇÃO EM AGITADOR DO TIPO *SHAKER*



3.8 TESTE DO ACÚMULO DO ZINCO X TEMPO DE CULTIVO

Neste teste foi estudada a relação entre o acúmulo do zinco e o tempo de cultivo para a produção de biomassa, visto que no item 3.7 somente foi avaliada a concentração de zinco presente na biomassa produzida no tempo de 120 horas de cultivo. A cepa utilizada neste experimento foi a *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y

27063, pois esta obteve o melhor acúmulo de zinco em sua biomassa no teste descrito no item 3.7.

O meio de cultivo utilizado em todos os testes foi o seguinte: Melaço de cana-de-açúcar, 5 ° Brix; Extrato de Levedura, 10 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L; KH_2PO_4 , 5 g/L; MgSO_4 , 0,5 g/L. O volume final dos experimentos foi de 100 mL, adicionado em frascos Erlenmeyer de 250 mL e estes cobertos com tampão de algodão permeável ao oxigênio. A esterilização do meio foi realizada conforme o item 3.6.

O inóculo foi preparado conforme o item 3.5. A quantidade de inóculo adicionada foi de 10% referente ao volume total. O preparo das soluções de ZnSO_4 e MgSO_4 e a adição das mesmas e do inóculo ao meio de cultivo é descrito no item 3.6. A concentração de ZnSO_4 adicionada no meio de cultivo foi de 0,5 g/L, visto que a cepa selecionada *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 demonstrou boa resistência a altas concentrações de zinco no meio de cultivo nos experimentos realizados no item 3.7.

Os testes foram realizados em agitador do tipo *Shaker* e em duplicata. As condições físicas utilizadas foram: temperatura, 30 °C; pH, 6,0; agitação, 120 rpm. Os tempos de crescimento estudados foram: 24, 48, 72, 96, e 120 horas.

Foram avaliadas as biomassas obtidas em relação ao teor de zinco presente nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas de cultivo, conforme o item 3.14.1.3, e em relação ao peso seco obtido nas mesmas condições nos mesmos tempos de cultivo, conforme o item 3.14.1.5.

3.9 TESTE DA ADAPTAÇÃO DA CEPA DE *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y27063 EM MEIO CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ZINCO

Neste estudo foi avaliada a capacidade de armazenamento de zinco da levedura *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 adaptada ao zinco, e da mesma levedura não adaptada a este metal.

Uma forma de tornar um microrganismo mais resistente e eficiente ao acúmulo de metais é a adaptação de suas células ao aumento progressivo de concentrações maiores de metal (DONMEZ e AKSU, 1999). O método de adaptação aplicado é conhecido como sementeira, e trata-se da pré-adaptação da cepa ao metal, através

da adição do mesmo ao meio de crescimento do inóculo da cepa, com aumentos progressivos de concentração.

A cepa adaptada foi inoculada inicialmente em um tubo de ensaio com 10 mL de meio YM líquido, com concentração de 0,05 g/L de ZnSO_4 . Após ser atingida a concentração na ordem de 1×10^7 a 1×10^8 células/mL neste inóculo, verificada através de método descrito no item 3.14.2.1, 10% do volume deste inóculo foi transferido para outro tubo de ensaio, contendo o meio YM líquido e a concentração de 0,1 g/L de ZnSO_4 . O aumento progressivo da concentração do metal no meio de cultivo YM líquido foi realizado posteriormente conforme descrito acima, nas concentrações 0,2 g/L; e 0,5 g/L.

O meio de cultivo utilizado em todos os testes foi o seguinte: Melaço de cana-de-açúcar, 5 °Brix; Extrato de Levedura, 10 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L; KH_2PO_4 , 5 g/L; MgSO_4 , 0,5 g/L. O volume final dos experimentos foi de 100 mL, adicionado em frascos Erlenmeyer de 250 mL e estes cobertos com tampão de algodão permeável ao oxigênio. A esterilização do meio foi realizada conforme o item 3.6.

O inóculo foi preparado conforme o item 3.5. A quantidade de inóculo adicionada foi de 10% referente ao volume total. O preparo das soluções de ZnSO_4 e MgSO_4 e a adição das mesmas e do inóculo ao meio de cultivo é descrito no item 3.6. As concentrações utilizadas de ZnSO_4 nos testes realizados com células adaptadas e não adaptadas foram de 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 1,0 g/L.

Os testes foram realizados em agitador do tipo *Shaker* e em duplicata. As condições físicas utilizadas foram: temperatura, 30 °C; pH inicial, 6,0; agitação, 120 rpm; tempo de cultivo, 120 horas.

A viabilidade celular dos testes em todas as concentrações de ZnSO_4 foi avaliada nos tempos de cultivo 8, 16, 24, 32, 38, 48, 54, 62, 72, 78, 86, 96, 102 e 120 horas, utilizando-se o método descrito no item 3.5. Foi realizada a visualização em microscópio óptico das células dos testes em todas as concentrações de ZnSO_4 , conforme o item 3.14.2.2, nos tempos de cultivo descritos acima.

Foram avaliadas as biomassas obtidas em relação ao teor de zinco presente no tempo de 120 horas de cultivo, conforme o item 3.14.1.3, e em relação ao peso seco obtido nas mesmas condições no mesmo tempo de cultivo, conforme o item 3.14.1.5.

3.10 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES QUÍMICAS E FÍSICAS PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM ZINCO ORGÂNICO

3.10.1 Fonte de Carbono

Nesta etapa foi estudada a melhor fonte de carbono a ser utilizada pela cepa *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 durante a produção de biomassa rica em zinco. Dois resíduos agrícolas, utilizados com fontes de carbono, foram testados: melaço de cana-de-açúcar e melaço de soja.

A cepa não adaptada ao zinco de *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 foi utilizada nos testes, pois obteve melhores resultados de acúmulo de zinco no teste descrito no item 3.9.

Os melaços de cana-de-açúcar e de soja foram adicionados ao meio de cultivo nas concentrações 5, 10 e 15 °Brix. Além disso, o meio de cultivo utilizado em todos os testes continha os seguintes ingredientes: Extrato de Levedura, 10 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L; KH_2PO_4 , 5 g/L; MgSO_4 , 0,5 g/L. O volume final dos experimentos foi de 100 mL, adicionado em frascos Erlenmeyer de 250 mL e estes cobertos com tampão de algodão permeável ao oxigênio. A esterilização do meio foi realizada conforme o item 3.6.

O inóculo foi preparado conforme o item 3.5. A quantidade de inóculo adicionada foi de 10% referente ao volume total. O preparo das soluções de ZnSO_4 e MgSO_4 e a adição das mesmas e do inóculo ao meio de cultivo é descrito no item 3.6. A concentração de ZnSO_4 utilizada nos meios de cultivo foi de 1,0 g/L.

Os testes foram realizados em agitador do tipo *Shaker* e em duplicata. As condições físicas utilizadas foram: temperatura, 30 °C; pH inicial, 6,0; agitação, 120 rpm; tempo de cultivo, 120 horas.

Foram avaliadas as biomassas obtidas em relação ao teor de zinco presente no tempo de 120 horas de cultivo, conforme o item 3.14.1.3, e em relação ao peso seco obtido nas mesmas no mesmo tempo de cultivo, conforme o item 3.14.1.5.

3.10.2 Fonte de Nitrogênio Orgânico

Neste teste determinou-se a melhor fonte de nitrogênio orgânico para o acúmulo do zinco pela cepa *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 não adaptada. Foram testadas as seguintes matérias primas: Extrato de Levedura, Peptona Caseinada, e Caldo Triptona de Soja, todas estas fontes ricas em proteínas. Também foram testados novamente os dois resíduos agroindustriais, fontes de carbono - melaço de cana-de-açúcar e melaço de soja - a 5° Brix, concentração esta onde foram obtidos os melhores resultados de acúmulo de zinco pela biomassa no teste realizado no item 3.10.1.

As fontes de nitrogênio orgânico foram adicionadas em diferentes concentrações, pois os mesmos têm diferentes níveis de nitrogênio. O Extrato de Levedura possui em sua composição 10,5 % de nitrogênio, enquanto que a Peptona Caseinada e o Caldo Triptona de Soja contêm 13,0 %. Logo, o extrato de levedura foi adicionado na concentração de 10 g/L, a Peptona Caseinada, 8,0 g/L; e o Caldo de Triptona de Soja, 8,0 g/L.

Além disso, o meio de cultivo utilizado em todos os testes continha os seguintes ingredientes: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L; KH_2PO_4 , 5 g/L; MgSO_4 , 0,5 g/L. O volume final dos experimentos foi de 100 mL, adicionado em frascos Erlenmeyer de 250 mL e estes cobertos com tampão de algodão permeável ao oxigênio. A esterilização do meio foi realizada conforme o item 3.6.

O inóculo foi preparado conforme o item 3.5. A quantidade de inóculo adicionada foi de 10% referente ao volume total. O preparo das soluções de ZnSO_4 e MgSO_4 e a adição das mesmas e do inóculo ao meio de cultivo é descrito no item 3.6. A concentração de ZnSO_4 utilizada nos meios de cultivo foi de 1,0 g/L.

Os testes foram realizados em agitador do tipo *Shaker* e em duplicata. As condições físicas utilizadas foram: temperatura, 30 °C; pH inicial, 6,0; agitação, 120 rpm; tempo de cultivo, 120 horas.

Foram avaliadas as biomassas obtidas em relação ao teor de zinco presente no tempo de 120 horas de cultivo, conforme o item 3.14.1.3, e em relação ao peso seco obtido nas mesmas no mesmo tempo de cultivo, conforme o item 3.14.1.5.

3.10.3 Delineamento Experimental

3.10.3.1 Planejamento Fatorial Fracionário 2⁸⁻⁴

Nesta etapa foi utilizado como ferramenta o planejamento fatorial fracionário na seleção das variáveis significativas na produção da levedura *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 não adaptada ao zinco, com intuito de produzir biomassa rica em zinco orgânico.

Para a otimização das condições de produção de biomassa rica em zinco foi utilizado o planejamento fatorial fracionário incompleto, permitindo o estudo da influência de 8 variáveis independentes com 16 ensaios. As variáveis independentes foram distribuídas em dois níveis e foram as seguintes: concentração de ZnSO₄, concentração de MgSO₄, concentração de KH₂PO₄, concentração de Extrato de Levedura; °Brix adicionados da fonte de carbono, concentração de Fe₂(SO₄)₃, tempo de adição da solução de zinco no fermentado, e pH.

O inóculo foi preparado conforme o item 3.5. A quantidade de inóculo adicionada foi de 10% referente ao volume total. O preparo das soluções de ZnSO₄ e MgSO₄ e a adição das mesmas e do inóculo ao meio de cultivo é descrito no item 3.6.

Os testes foram realizados em agitador do tipo *Shaker* e em duplicata. As condições físicas utilizadas foram: temperatura, 30 °C; pH inicial, 6,0; agitação, 120 rpm; tempo de cultivo, 120 horas.

Os níveis das variáveis foram definidos conforme a citação em literatura da influência das mesmas sobre os níveis de acúmulo de metais. O acúmulo de metais por leveduras é influenciado por uma série de fatores, como as propriedades físico-químicas do metal; fisiologia da célula; e condições do ambiente, como pH e temperatura (STOLL e DUNCAN, 1996).

Os níveis codificados e decodificados de cada variável são apresentados na tabela 6. Cada planejamento consistiu em 16 ensaios, sendo estes realizados em duplicata.

TABELA 6 – VALORES (REAIS E CODIFICADOS) DAS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2⁸⁻⁴

Fatores	Termos codificados	
	-1	+1
Concentração de ZnSO ₄ (g/L)	1,0	2,5
Concentração de MgSO ₄ (g/L)	0,5	5,0
Concentração de KH ₂ PO ₄ (g/L)	5,0	10,0
Concentração de Extrato de Levedura (g/L)	5,0	10,0
°Brix adicionados da fonte carbono (Melaço de Soja)	5,0	10,0
Concentração de Fe ₂ (SO ₄) ₃ (g/L)	0,0	0,1
Tempo adição da solução de ZnSO ₄ no fermentado (h)	0	24
pH	6,0	7,0

Esta técnica, introduzida por BOX et al. (1978), tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos (KOEHLER, 1999; MOTTA e WAGNER, 2001). Utilizou-se o programa Statistica 6.0 para a análise dos resultados.

Foram avaliadas as biomassas obtidas em relação ao teor de zinco presente no tempo de 120 horas de cultivo, conforme o item 3.14.1.3.

3.10.3.2 Planejamento Fatorial Completo 3²

Neste teste foi aplicado o planejamento fatorial completo, com o intuito de se estudar as variáveis detectadas como significativas no estudo do item 3.10.3.1, que foram a concentração de ZnSO₄ e a concentração de Fe₂(SO₄)₃, no cultivo da levedura *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 não adaptada ao zinco.

As variáveis °Brix e tempo de adição da solução de ZnSO₄ não foram estudados neste planejamento. A diminuição de °Brix na formulação não seria aconselhável, pois isto iria atuar diretamente sobre o crescimento celular, diminuindo muito a produtividade da biomassa (conforme observado nos testes do item 4.5.1 – Fonte de Carbono). Já o tempo de adição da solução de ZnSO₄ não pode ser ainda mais diminuído, pois o menor utilizado foi de 0 horas.

A concentração dos nutrientes no meio de cultivo foram as seguintes: MgSO₄, 0,5 g/L; KH₂PO₄, 5,0 g/L; Extrato de levedura, 5,0 g/L; Melaço de Soja, 5 °Brix.

O inóculo foi preparado conforme o item 3.5. A quantidade de inóculo adicionada foi de 10% referente ao volume total. O preparo das soluções de ZnSO₄ e

MgSO₄ e a adição das mesmas e do inóculo ao meio de cultivo é descrito no item 3.6.

Os testes foram realizados em agitador do tipo *Shaker* e em duplicata. As condições físicas utilizadas foram: temperatura, 30 °C; pH inicial, 6,0; agitação, 120 rpm; tempo de cultivo, 120 horas, tempo de adição da solução de ZnSO₄ no fermentado, 0 horas.

As duas variáveis independentes com valor de efeito positivo foram estudadas: a concentração de ZnSO₄ e a concentração de Fe₂(SO₄)₃. A otimização foi efetuada através de um Planejamento Fatorial Completo 3², sendo que as variáveis foram distribuídas em três níveis. Os níveis codificados e decodificados de cada variável são apresentados na Tabela 7. O planejamento utilizado resultou em 9 ensaios, sendo estes realizados em duplicata.

TABELA 7 – VALORES (REAIS E CODIFICADOS) DAS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 3²

Fatores	Termos codificados		
	-1	0	+1
Concentração de ZnSO ₄ (g/L)	2,0	6,0	10,0
Concentração de Fe ₂ (SO ₄) ₃ (g/L)	0,1	0,3	0,5

Foram avaliadas as biomassas obtidas em relação ao teor de zinco presente no tempo de 120 horas de cultivo, conforme o item 3.14.1.3.

3.11 TESTES DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE ZINCO ORGÂNICO ADSORVIDO E ABSORVIDO

3.11.1 Rompimento Celular

Três técnicas de rompimento celular foram empregadas com o objetivo de obter-se a lise da célula da levedura *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063. Após a ruptura das membranas deste microrganismo foi possível identificar e quantificar as diferentes espécies de zinco presentes na levedura estudada.

3.11.1.1 Rompimento Celular - Sonicação

Pesou-se 0,5 g de biomassa em um béquer, obtida de teste realizado em frasco Erlenmeyer sob as condições otimizadas no item 3.10.3.1, e adicionou-se 10 mL de água deionizada. Esta suspensão foi dividida em três partes iguais e foi submetida a três tipos diferentes de experimentos: 4 tratamentos a 100 Hz por 30 segundos, com 30 segundos de intervalo entre cada; 4 tratamentos a 100 Hz por 30 segundos, com 30 segundos de intervalo entre cada, logo após foi submetido ao congelamento/descongelamento; 4 tratamentos a 100 Hz por 30 segundos, com 30 segundos de intervalo entre cada, logo em seguida sofreu aquecimento por 10 minutos a 65 °C.

O rompimento celular foi verificado através de visualização da suspensão em microscópio óptico, conforme o item 3.14.2.2.

3.11.1.2 Rompimento Celular - Adição de etanol, NaCl e pré-autolisado

O método de rompimento celular foi realizado conforme SGARBIERI et al. (1999) e ALVIM et al. (2002). A biomassa utilizada foi obtida em teste realizado em frasco Erlenmeyer sob as condições otimizadas no item 3.10.3.1. As condições utilizadas nos experimentos foram as seguintes: suspensão de levedura a 10% (p/v); adição de plasmolisantes, NaCl 2% (p/p), etanol 7% (p/p); adição de pré-autolisado 7% (v/v); temperatura de 55°C; pH 5,0 a 5,5; tempo de autólise de 24 horas. O pré-autolisado foi produzido a partir de uma suspensão de levedura a 10% (p/v) e autolisada nas condições prescritas, exceto pelo tempo de autólise, que foi de apenas 6 horas. Terminada a autólise, a temperatura foi elevada para 85 °C e mantida por 15 minutos, para inativação enzimática. Em seguida, o autolisado foi resfriado e centrifugado.

O rompimento celular foi verificado através de visualização da suspensão em microscópio óptico, conforme o item 3.14.2.2.

3.11.1.3 Rompimento Celular - Adição de álcali e aquecimento

Pesou-se 0,5 g de biomassa em um béquer, obtida de teste realizado em frasco Erlenmeyer sob as condições otimizadas no item 3.10.3.1, e adicionou-se 10 mL de água deionizada. Em seguida o pH da suspensão foi ajustado para 11,0, através de adição de solução de hidróxido de sódio 1,0 N. Agitou-se a suspensão por 15 minutos, e ajustou-se novamente o pH da mesma para 7,0. Logo em seguida, a suspensão foi aquecida a 65 °C por 30 minutos.

O rompimento celular foi verificado através de visualização da suspensão em microscópio óptico, conforme o item 3.14.2.2.

3.11.2 Separação do Zinco Orgânico Adsorvido, Zinco Orgânico Absorvido e Zinco Livre

Após o rompimento celular, utilizando a técnica descrita no item 3.11.1.3, a suspensão foi centrifugada a 4000 rpm, por 10 minutos. O precipitado obtido era a fração Zinco Orgânico Adsorvido, e o sobrenadante continha as frações Zinco Orgânico Absorvido e Zinco Livre restante na biomassa. Para a separação destas duas frações, adicionou-se ao sobrenadante uma solução salina de NaCl a 10%, o que provocou a precipitação da proteínas ali presentes. A suspensão foi centrifugada a 4000 rpm, por 10 minutos. O precipitado resultante foi a fração Zinco Orgânico Absorvido, e o sobrenadante continha o Zinco livre presente na biomassa produzida.

Todas as frações de zinco identificadas foram quantificadas pelo método descrito no item 3.14.1.3.

3.12 CINÉTICA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM ZINCO ORGÂNICO

Após a otimização das condições físico-químicas do processo de cultivo da levedura *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063, avaliou-se a evolução das variáveis do processo de produção de biomassa enriquecida com zinco orgânico.

O meio utilizado foi: 5 °Brix de melaço de soja; Extrato de Levedura, 5,0 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5,0 g/L; KH_2PO_4 , 5,0 g/L; ZnSO_4 , 10,0 g/L; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, 0,1 g/L; MgSO_4 , 0,5 g/L. O cultivo das leveduras foi realizado em sistema de batelada e volume de meio de 1,5 L. O biorreator utilizado foi um fermentador da marca Inceltech LH – SGI (set 2M), com 2 L de capacidade (ver Figura 11).

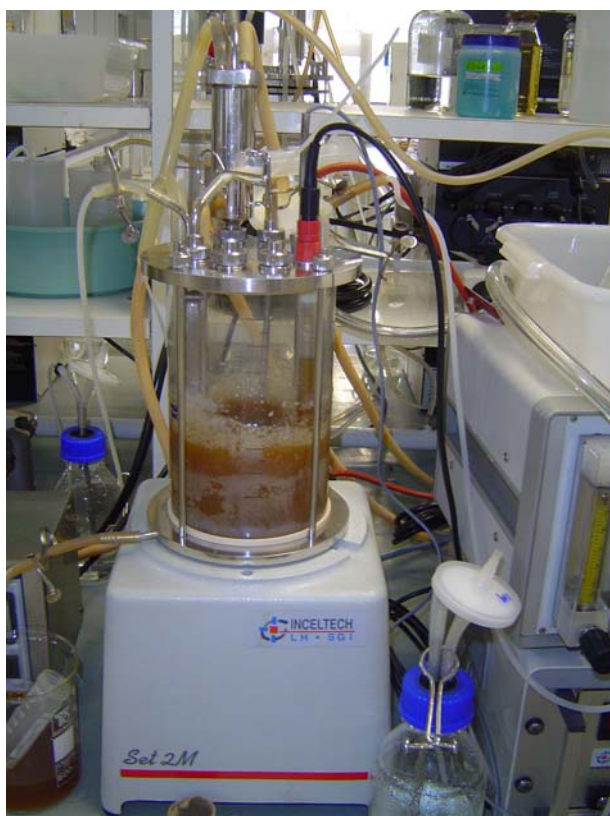
O inóculo foi preparado conforme o item 3.5. A quantidade de inóculo adicionada foi de 10% referente ao volume total. O preparo das soluções de ZnSO_4 e MgSO_4 e a adição das mesmas e do inóculo ao meio de cultivo é descrito no item 3.12.

As condições físicas utilizadas foram: temperatura, 30 °C; pH inicial, 6,0; agitação, 200 rpm; aeração, 1 v/v/min; tempo de cultivo, 168 horas.

As biomassas obtidas foram submetidas às metodologias desenvolvidas nos itens 3.11.1.3 e 3.11.2.

Foram realizadas as seguintes análises para os tempos de cultivo de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas: peso seco (conforme o item 3.14.1.5) e determinação da concentração do zinco na biomassa obtida (conforme o item 3.14.1.3).

FIGURA 11 – FERMENTADOR INCELTECH LH SGI – SET 2M



3.13 TESTE DE PRODUÇÃO DE VITAMINA B₂

Neste estudo foi analisada a possibilidade de produção de vitamina B₂ extracelular pela cepa *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 não adaptada ao zinco.

A formulação do meio de cultivo utilizado foi idêntica à utilizada no item 3.12. O volume final dos experimentos foi de 100 mL, adicionado em frascos Erlenmeyer de 250 mL e estes cobertos com tampão de algodão permeável ao oxigênio. A esterilização do meio foi realizada conforme o item 3.6.

O inóculo foi preparado conforme o item 3.5. A quantidade de inóculo adicionada foi de 10% referente ao volume total. O preparo das soluções de ZnSO₄ e MgSO₄ e a adição das mesmas e do inóculo ao meio de cultivo é descrito no item 3.6.

Os testes foram realizados em agitador do tipo *Shaker* e em duplicata. As condições físicas empregadas foram: temperatura, 30 °C; pH, 6,0; agitação, 120 rpm; tempo de cultivo, 120 horas. Foram realizados dois testes: um em presença de luz, outro em ausência de luz, protegendo-se o Erlenmeyer com papel laminado.

Após 120 horas de cultivo em presença/ausência de luz, o cultivo de *P. guilliermondii* foi coletado assepticamente e armazenado no escuro até ser centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos para a separação da massa celular do sobrenadante.

No filtrado livre de células determinou-se o conteúdo de riboflavina extracelular (conforme o item 3.14.1), cobrindo sempre as amostras com papel laminado para evitar a degradação dessa vitamina pela luz.

3.14 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS QUÍMICO-MICROBIOLÓGICAS

3.14.1 Químicas

3.14.1.1 Determinação do pH

O pH do meio de cultivo utilizado foi determinado através de um potenciômetro digital modelo HI 9321 – HANNA Instruments. O sensor do aparelho foi imerso na solução e o valor do pH foi quantificado pelo aparelho.

3.14.1.2 Determinação de açúcares totais

Os açúcares totais foram determinados pelo método espectrofotométrico de Somogyi-Nelson (SOMOGYI, 1945; NELSON, 1944), a 535 nm.

A inversão da sacarose foi realizada por hidrólise ácida. Transferiu-se 1 mL da amostra para um frasco volumétrico e adicionou-se 50 mL de água destilada e 2 mL de ácido clorídrico. A solução diluída foi aquecida em banho maria a 90 °C por 20 minutos, e em seguida resfriou-se a solução até temperatura ambiente. Adicionou-se solução de hidróxido de sódio 40% até a neutralização da solução da amostra. Ela foi transferida então para um balão volumétrico de 100 mL, e seu volume foi completado com água destilada e a solução foi filtrada. A partir desta solução foi feita a diluição necessária para a determinação, conforme curva padrão realizada com glicose. A curva padrão de calibração dos açúcares totais foi feita tomando-se volumes das soluções de trabalho de glicose, que continham 10 a 100 µg/mL do açúcar.

Foram adicionados em um tubo de ensaio 1 mL da diluição realizada da solução da amostra e 1 mL da solução de Somogyi Nelson A, e este foi aquecido por 10 minutos em banho maria. Esfriou-se o tubo de ensaio, adicionou-se 1 mL da solução Somogyi Nelson B e agitou-se vigorosamente. Adicionou-se 7 mL de água destilada e homogeneizou-se a mistura. Procedeu-se então à leitura de absorbância em comprimento de onda de 535 nm. Uma prova em branco foi realizada utilizando-se as mesmas condições.

Os resultados foram expressos em g/L de açúcares redutores.

3.14.1.3 Determinação de Zinco

A determinação do zinco presente na biomassa foi realizada conforme o método da AOAC (1997).

A amostra foi previamente digerida, através da adição 5 mL de ácido nítrico e 1 mL de peróxido de oxigênio a 0,15 g de biomassa em um balão de digestão de 250 mL. A amostra foi digerida por cerca de 1 hora sob refluxo em chapa, ou até a ausência de desprendimento de vapores nitrosos amarelos pelo tubo refrigerador e a amostra estar límpida. Após esta etapa, a solução foi filtrada e foi feita a aferição do volume para 100 mL com água deionizada em balão volumétrico.

A leitura da solução foi realizada em um equipamento de espectrometria de absorção atômica, Modelo Spectraa 100-200 AA Varian, sob as seguintes condições analíticas: corrente de lâmpada, 9 mA; combustível, acetileno; suporte, ar; estequiometria da chama, oxidante; comprimento de onda, 213,9 nm; fenda, 1,0 nm.

A curva padrão de calibração foi elaborada partindo-se de uma solução padrão Merck de 1 g/L. Desta solução foi pega uma alíquota de 5 mL, que foi colocada em balão volumétrico de 50 mL. Obtém-se a solução intermediária de 0,1 g/L. Desta solução intermediária, foi feita a curva de trabalho para o zinco, que foi de 0,6; 1,0; 2,0; e 4,0 mg/L.

O resultado da leitura foi expresso em mg de zinco/kg de peso seco de biomassa.

3.14.1.4 Determinação da Vitamina B₂

A análise de quantificação da vitamina B₂ foi realizada utilizando-se a metodologia sugerida pela AOAC (1997). Esta metodologia faz uso do método fluorimétrico, com excitação em comprimento de onda de 444 nm e medida da intensidade de fluorescência em 530 nm.

O resultado da leitura foi expresso em µg/mL de fermentado.

3.14.1.5 Determinação do peso seco de biomassa produzida

A quantidade de biomassa produzida foi determinada através do método gravimétrico (Peso Seco).

Os tubos de centrifuga foram previamente pesados após uma hora em estufa a 105 °C. Adicionou-se aos tubos as biomassas resultante do cultivo, e eles foram colocados em estufa a 60 °C, por 24 horas. Após este período, os tubos foram pesados em balança analítica.

O resultado da análise foi expresso em g de peso seco / L de fermentado.

$$\text{Peso Seco (g/L)} = (\text{Peso Tubo com a Biomassa (g)} - \text{Peso Tubo vazio (g)}) \times 1.000 / \text{Volume de fermentado utilizado (mL)}$$

3.14.2 Microbiológicas

3.14.2.1 Contagem celular / Viabilidade celular

A porcentagem de células vivas foi determinada por meio de exame a fresco da suspensão de leveduras coradas com azul de metileno, de acordo com PIERCE (1970) e ANTONINI (2004).

A determinação da viabilidade celular foi iniciada realizando-se a diluição conveniente em um tubo de ensaio. Após a diluição, transferiu-se 0,3 mL da suspensão para um tubo de ensaio e adicionou-se 0,3 mL da solução de azul de metileno-citrato de sódio. Esta solução foi preparada adicionando-se 0,01 g de azul de metileno e 2 g de citrato de sódio a 100 mL de água destilada q.s.p.

A mistura foi então homogeneizada em um agitador de tubos, e um pequeno volume da mesma foi transferido para câmara de Neubauer (Figura 12) com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Cobriu-se a câmara de Neubauer com uma lamínula, e levou-se a mesma para contagem em microscópio óptico em objetiva de 40 vezes (aumento de 400 X). Contou-se aproximadamente 40 células por campo ou três células por retículo, escolhendo dois limites em cada quadrado, nos quais serão

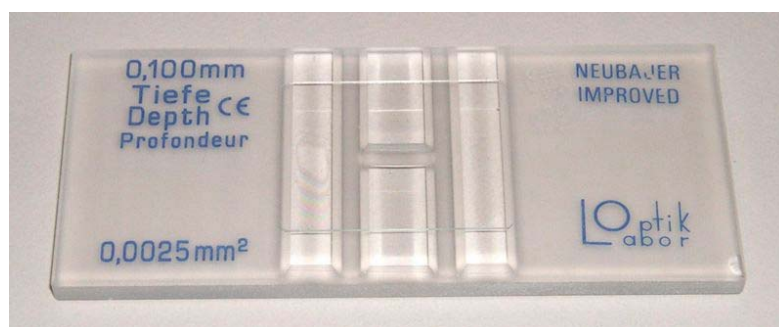
contadas as células que estão nos limites superior e lateral esquerdo do quadrado, e desprezadas as do limite inferior e lateral direito.

As células coradas com o corante azul de metileno foram identificadas como sendo mortas, enquanto que as que não adquiriram a pigmentação foram classificadas como viáveis. Os resultados obtidos foram calculados utilizando as seguintes fórmulas:

$$\text{Viabilidade (\%)} = (\text{Número de células vivas} / \text{Número total de células}) \times 100$$

$$\text{Número total de células/mL} = \text{Número de células nos 25 campos} \times \text{Diluição} \times 10^4$$

FIGURA 12 – CÂMARA DE NEUBAUER



FONTE: WIKIPEDIA, 2007a.

3.14.2.2 Análise microscópica das células das leveduras

A observação da morfologia das células das leveduras foi realizada em microscópio óptico da marca Leica DMLS, com câmera Sony Hyper HAD.

Uma gota da suspensão de células foi depositada sob uma lâmina de vidro com auxílio de uma pipeta, e coberta com uma lamínula. As células de levedura foram observadas em aumento de 100 vezes no microscópio óptico.

3.15 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUBSTRATOS

Com o objetivo de se estabelecer as características físico-químicas dos substratos utilizados nos cultivos, que foram o melaço de cana-de-açúcar e do melaço de soja, determinou-se os teores de açúcares totais, açúcares redutores, sólidos solúveis (° Brix), proteína, matéria graxa e zinco, conforme observado na Tabela 8. As análises foram realizadas em duplicata.

TABELA 8 – MÉTODOS UTILIZADOS NA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUBSTRATOS DAS FERMENTAÇÕES

Determinação	Descrição	Método
Açúcares totais	Método espectrofotométrico de Somogyi-Nelson	SOMOGYI (1945); NELSON (1944)
Açúcares redutores	Método espectrofotométrico de Somogyi-Nelson	SOMOGYI (1945); NELSON (1944)
Sólidos solúveis (° Brix)	Método utilizando Refratômetro	-
Proteína	Fração protéica determinada indiretamente, a partir da determinação da concentração de nitrogênio pelo método de Kjeldahl	INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985)
Matéria Graxa (%)	Determinação do teor de matéria graxa foi realizada em extrator Soxleth completo, utilizando-se éter de petróleo para a extração	AOAC (1997)
Zinco (mg/kg)	Determinação em aparelho espectrofotômetro de absorção atômica.	AOAC (1997)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS MELAÇOS

4.1.1 Melaço de Cana-de-Açúcar

Determinou-se a composição do melaço de cana-de-açúcar, com o intuito de se verificar a sua utilização como substrato para o cultivo de leveduras, obtendo-se assim uma biomassa rica em zinco orgânico.

O melaço de cana-de-açúcar utilizado apresenta um teor alto de açúcares não redutores, como por exemplo, a sacarose. Este tipo de açúcares é a diferença entre açúcares totais e açúcares redutores em sua composição. Este fato, porém, não irá comprometer a atuação deste resíduo como fonte de carbono. A proporção C/N encontrada foi de 29,72.

Os resultados de açúcares totais, açúcares redutores, sólidos solúveis (°Brix), proteína e zinco, determinados para o melaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho são apresentados na Tabela 9.

TABELA 9 - COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Parâmetros	Valores experimentais	Valores Teóricos
Açúcares Totais (g/L)	540,98	522,00*
Açúcares Redutores (g/L)	54,99	209,80*
Sólidos Solúveis (°Brix)	59,5	42,80*
Proteína (g/L)	45,5	43,7*
Zinco (mg/kg)	10,7	13,3 **

FONTE: * HENGEL LTDA, 2007.

** ICIDCA, 1999.

4.1.2 Melaço de Soja

O resíduo industrial melaço de soja também foi submetido a análises físico-químicas, com o objetivo de ser aplicado como fonte de carbono nos experimentos de cultivo com leveduras para a produção de biomassa rica em zinco orgânico.

Apesar do melaço de soja utilizado nos experimentos apresentar um valor de açúcares totais (354,71 g/L) abaixo do valor encontrado em literatura (483,00 g/L), assim como o teor de °Brix, que foi de 65,0, o mesmo ainda está adequado para uso, pois pode ser considerado uma fonte rica de carbono (UNITED STATES SUGAR CORPORATION, 2007). Além disso, possui alto teor de proteínas em sua composição, cerca de 94 g/L, o que tem grande importância, sendo que este fator pode influenciar positivamente o acúmulo de zinco pela biomassa produzida. A proporção C/N deste resíduo foi de 15,10.

Os resultados de açúcares totais, açúcares redutores, sólidos solúveis (°Brix), proteína, matéria graxa e zinco, determinados para o melaço de soja estão descritos na Tabela 10.

TABELA 10 - COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MELAÇO DE SOJA

Parâmetros	Valores experimentais	Valores teóricos
Açúcares Totais (g/L)	354,71	483,00*
Açúcares Redutores (g/L)	188,14	115,00*
Sólidos Solúveis (°Brix)	65,0	86,0*
Proteína (g/L)	94,4	63,1*
Matéria Graxa (%)	21,2	-
Zinco (mg/kg)	6,5	8,0*

FONTE: *UNITED STATES SUGAR CORPORATION, 2007.

4.2 SELEÇÃO DAS CEPAS

O cultivo de SCP em meio com zinco utilizando leveduras oferece muitas vantagens em relação a outros microrganismos. Entre elas estão: sua capacidade

de assimilar grande variedade de substratos, suas altas velocidades de crescimento e a facilidade de separação de sua biomassa (ICIDCA, 1999). Além disso, elas são citadas na literatura como possuindo a habilidade de acumular esses metais em suas células, quando em crescimento em um meio contendo uma elevada quantidade de cátions metálicos (VOLESKY, 1990).

Cinco cepas de leveduras, pertencentes aos gêneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Pichia*, citados na literatura como produtores de SCP para consumo animal e humano, foram avaliadas (BEKATOROU et al, 2006).

O meio de cultivo utilizado foi elaborado com base nos experimentos realizados com *Saccharomyces cerevisiae* em meio rico em zinco desenvolvido por STEHLIK-THOMAS et al. (2004). As concentrações de ZnSO_4 testadas foram 0,05; 0,1; 0,2 e 0,5 g/L.

Os principais fatores levados em conta foram a sua capacidade de acumular zinco em sua célula, através de mecanismos de adsorção e absorção; e a produção de biomassa em meios de cultivo com alta concentração de ZnSO_4 (0,05; 0,1; 0,2 e 0,5 g/L). Na tabela 11 pode-se observar os valores obtidos de peso seco e zinco acumulado por todas as cepas estudadas.

TABELA 11 – RESULTADOS DE PESO SECO E ZINCO ACUMULADO PELAS CINCO CEPAS ESTUDADAS (TEMPO = 120 HORAS)

		Concentrações de ZnSO ₄ adicionadas (g/L)				
Cepas		0,0	0,05	0,1	0,2	0,5
<i>S. cerevisiae</i> NRRL YB 2293	Peso Seco (g/L)	8,24	10,02	9,56	9,79	10,01
	Zinco acumulado (mg/kg)	0,0105	139,34	492,30	602,33	1075,67
<i>S. cerevisiae</i> NRRL Y2034	Peso Seco (g/L)	7,00	6,78	6,70	7,09	9,06
	Zinco acumulado (mg/kg)	0,0051	48,79	90,49	1023,14	1412,67
<i>K. marxianus</i> NRRL Y8281	Peso Seco (g/L)	6,10	7,20	6,81	6,56	7,01
	Zinco acumulado (mg/kg)	0,0049	50,06	84,01	87,90	89,31
<i>Komagataella (Pichia) pastoris</i> NRRL Y1603	Peso Seco (g/L)	7,29	7,72	6,96	6,95	7,67
	Zinco acumulado (mg/kg)	0,0113	148,09	175,91	900,10	1595,54
<i>Pichia guilliermondii</i> Wickerham NRRL Y21063	Peso Seco (g/L)	8,03	8,06	8,28	9,58	9,83
	Zinco acumulado (mg/kg)	0,0207	713,86	1880,43	3698,68	6820,38

É possível observar que a cepa com maior acúmulo deste metal, após o tempo de cultivo de 120 horas, e em um meio de cultivo com concentração de 0,5 g/L de ZnSO₄, é a *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063. Ela produziu biomassa com o maior teor de zinco acumulado, que foi de 6.820 mg/kg de peso seco de biomassa. Também foi percebido que, conforme a concentração de ZnSO₄ adicionado ao meio de cultivo foi sendo aumentada nos testes realizados com esta cepa, aumentou também a concentração deste metal acumulado pela sua biomassa. Em todas as concentrações de ZnSO₄ adicionadas, a cepa *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 foi aquela que apresentou o maior acúmulo de zinco, conforme demonstrado na figura 13.

Com relação ao peso seco, a *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 também apresentou bons resultados, apresentando valores próximos à produção do *S. cerevisiae* YB 2293, que foi a cepa de levedura que demonstrou maior peso seco. Nem sempre se obteve o maior acúmulo de zinco coincidindo com o maior peso seco.

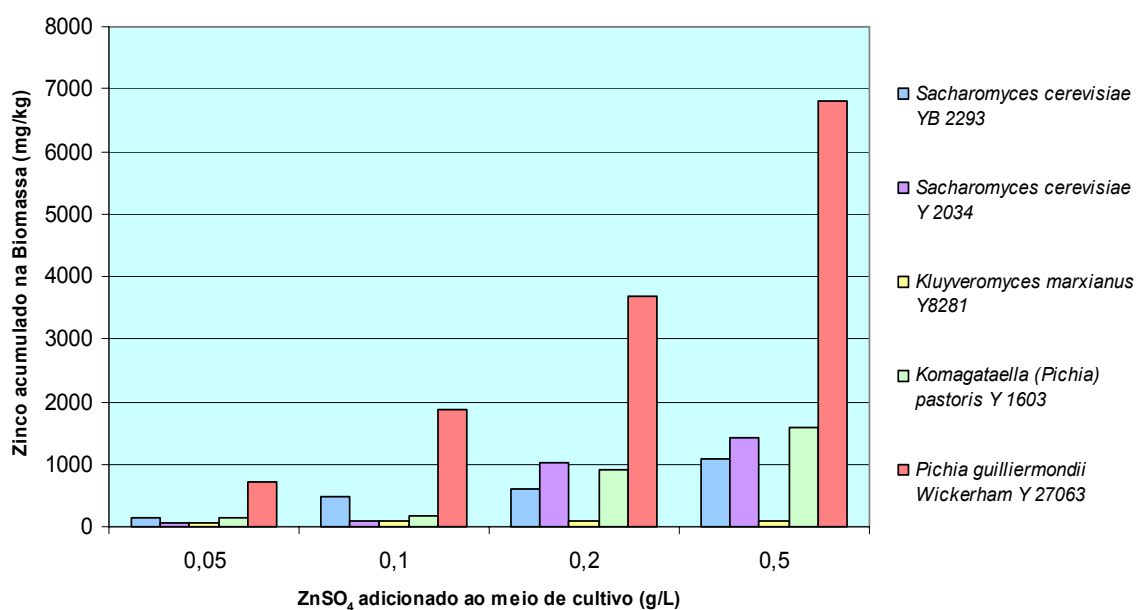
Uma baixa concentração de zinco foi encontrada nos testes realizados com 0,0 g/L de ZnSO₄, pois o melaço de cana-de-açúcar possui zinco em sua composição, conforme análise realizada no item 4.1.1.

As demais cepas não demonstraram uma boa capacidade de acúmulo de zinco em sua biomassa em 120 horas de cultivo, sendo que a cepa *K. marxianus* NRRL Y8281 obteve os menores valores de retenção de zinco na biomassa – no tempo de cultivo de 120 horas a concentração de zinco acumulado foi de apenas 89 mg/kg.

Estas cepas que não foram boas acumuladoras de zinco podem ter identificado as altas concentrações de zinco como um fator inibidor para o seu crescimento celular. Logo, a célula da levedura irá oferecer mecanismos de resistência à entrada deste metal no interior da mesma.

A Figura 13 apresenta os resultados obtidos referentes ao teor de zinco acumulado na biomassa das cepas de leveduras estudadas. O tempo de 120 horas de cultivo foi escolhido para a análise do teor de zinco acumulado pela biomassa das cepas estudadas, para possibilitar a ocorrência do processo de bioacumulação, isto é, a captura do metal pelo microrganismo tanto na forma passiva quanto na forma ativa.

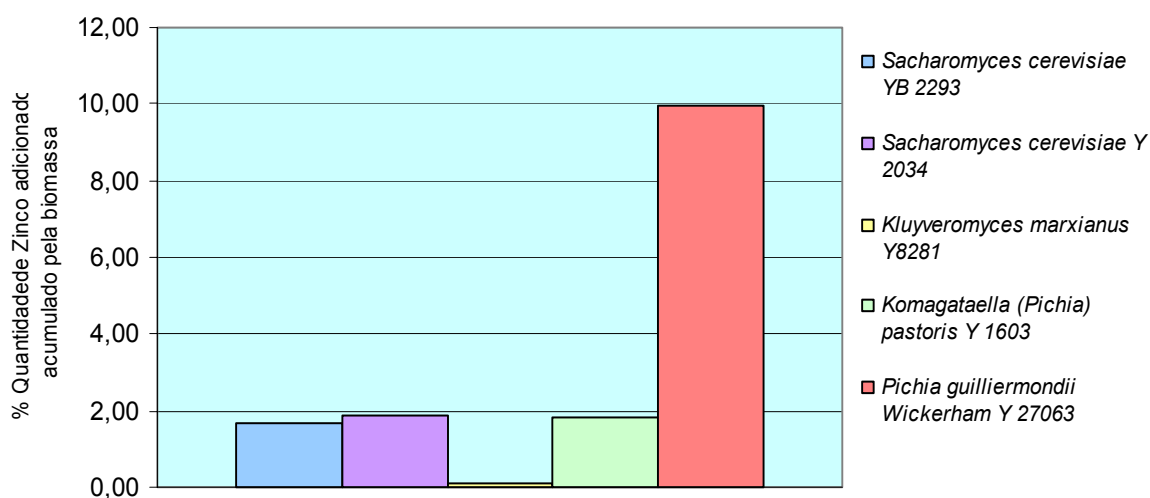
FIGURA 13 – ZINCO ACUMULADO PELA BIOMASSA PRODUZIDA, EM RELAÇÃO À QUANTIDADE DE ZnSO_4 ADICIONADO AO MEIO DE CULTIVO (TEMPO DE CULTIVO DE 120 HORAS)



É importante salientar que a produção de biomassa de levedura enriquecida com zinco através de fermentação líquida é pouco comentada na literatura, sendo que as espécies *Pichia* e *Kluyveromyces* nunca foram citadas para este fim. Para o enriquecimento de leveduras com zinco, STEHLIK-THOMAS et al. (2004), utilizaram as seguintes condições ótimas para a produção em batelada de biomassa rica em zinco de *S. cerevisiae*: temperatura de 30 °C, pH de 5,0, sob agitação de 150 rpm, e com uma adição de ZnSO_4 de 0,1 g/L.

Quando analisada a porcentagem de zinco presente no meio de cultivo que foi realmente retida pela biomassa de levedura (vide figura 14), após 120 horas de cultivo, em um meio de cultivo com 0,5 g/L, a cepa *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 reteve 9,97 % do zinco presente no meio (ver Figura 14).

FIGURA 14 – PORCENTAGEM DE ZnSO_4 ADICIONADO AO MEIO DE CULTIVO ACUMULADO PELA BIOMASSA PRODUZIDA (TEMPO DE CULTIVO DE 120 HORAS, CONCENTRAÇÃO DE ZnSO_4 ADICIONADA = 0,5g/L)



Com relação à influência do metal sobre a produção de biomassa, foram observadas as evoluções da biomassa produzida pelas cepas estudadas, durante 120 horas de cultivo, utilizando diferentes concentrações de ZnSO_4 no meio. O intuito foi avaliar se o zinco pode influenciar negativa ou positivamente o crescimento celular das 5 cepas estudadas, pois a literatura comenta sobre limitações práticas para a captura de metais utilizando células vivas, como a sensibilidade do sistema a altas concentrações de metal/sal (RADISKY e KAPALN, 1999).

As figuras 15, 16 e 17 ilustram o comportamento das cepas de leveduras *K. marxianus* NRRL Y8281, *S. cerevisiae* NRRL YB 2293 e *S. cerevisiae* NRRL Y2034 nas condições de cultivo estabelecidas, sob diferentes concentrações de ZnSO_4 (0; 0,05; 0,1; 0,2; e 0,5 g/L). Pode-se observar que o comportamento das três cepas é bastante similar: a concentração de açúcares totais consumidos nos três casos atingiu valores próximos a 0,0 g/L em 24 horas de cultivo; e o crescimento celular alcançou concentração máxima de biomassa em 24 horas de cultivo. Os valores máximos de produção de biomassa obtidos foram os seguintes: 10,09 g/L (*K.*

marxianus NRRL Y8281, no tempo 24 horas, com presença de 0,5 g/L de ZnSO_4), 10,23 g/L (*S. cerevisiae* NRRL Y2034, no tempo 24 horas, com presença de 0,5 g/L de ZnSO_4), e 10,49 g/L (*S. cerevisiae* NRRL YB 2293, no tempo 24 horas, com presença de 0,2 g/L de ZnSO_4).

Não foi observada influência negativa do zinco sob o crescimento celular em nenhuma das três cepas. As leveduras *K. marxianus* NRRL Y8281 e *S. cerevisiae* YB 2293, ao contrário, tiveram as menores concentrações de biomassa produzida em meio de cultivo com ausência de zinco (0,0 g/L de ZnSO_4).

FIGURA 15 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA PELA LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y8281 COM ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ZnSO_4 AO MEIO DE CULTIVO

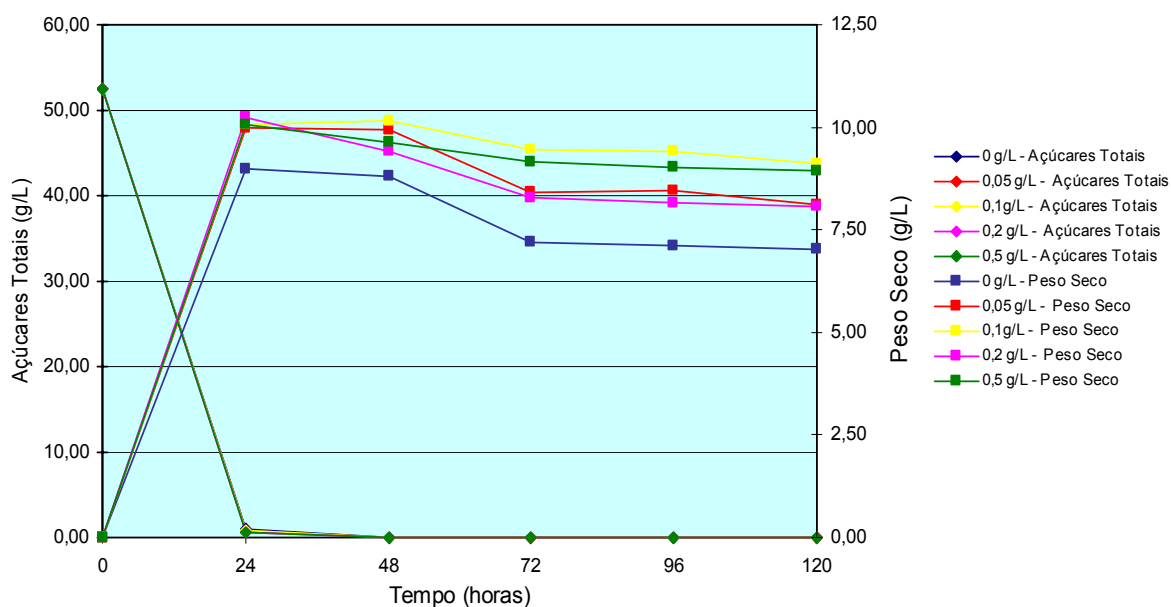


FIGURA 16 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA PELA LEVEDURA *Sacharomyces cerevisiae* NRRL Y2034 COM ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE $ZnSO_4$ AO MEIO DE CULTIVO

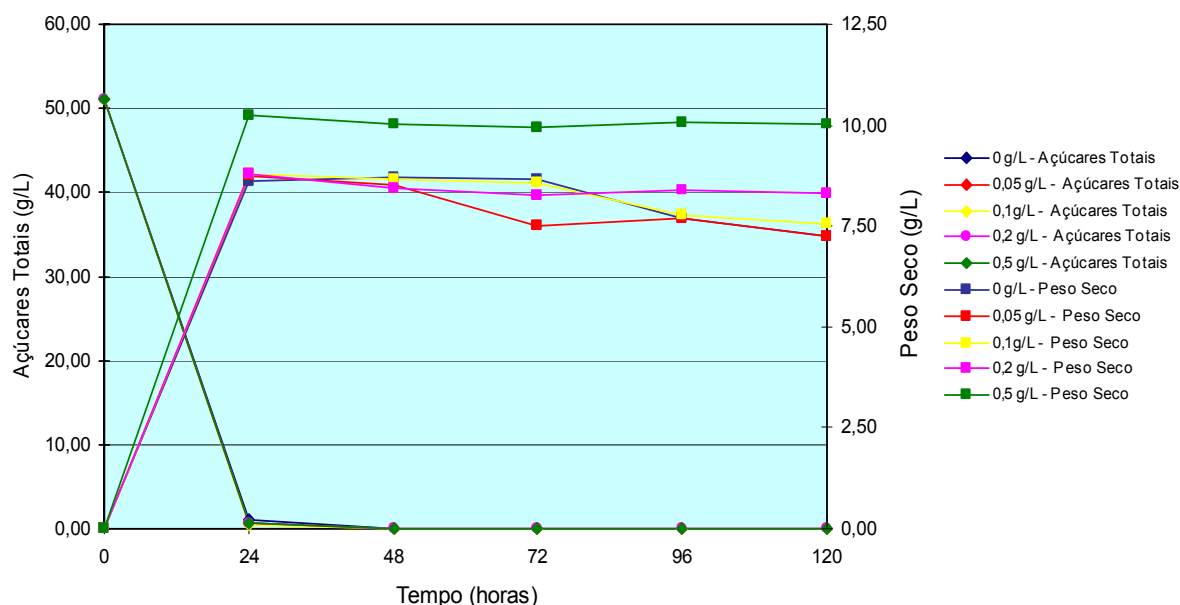
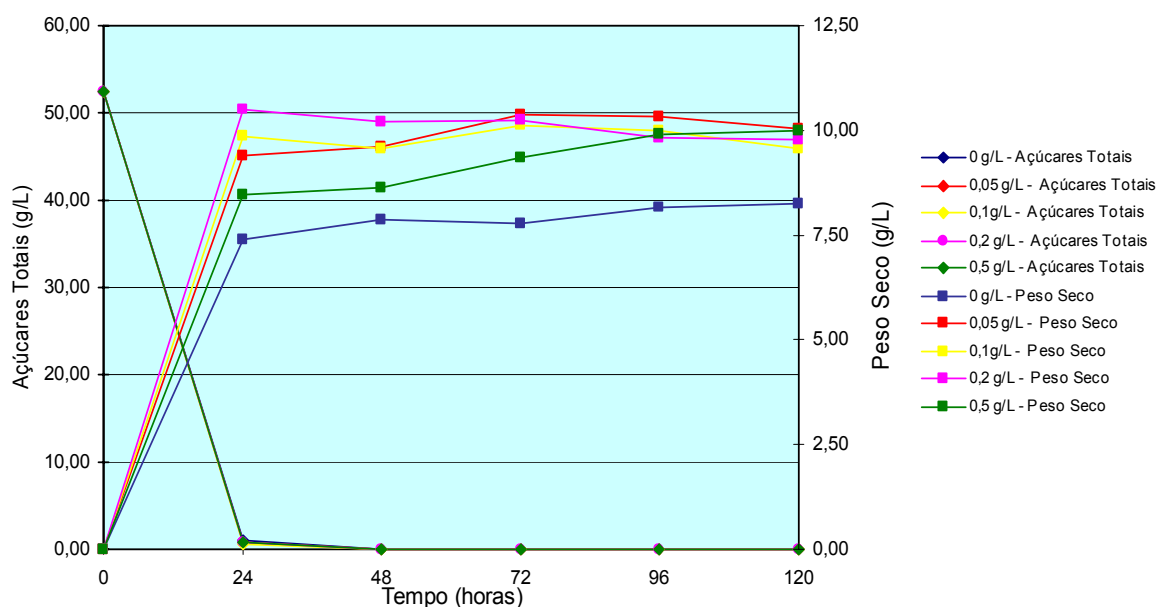


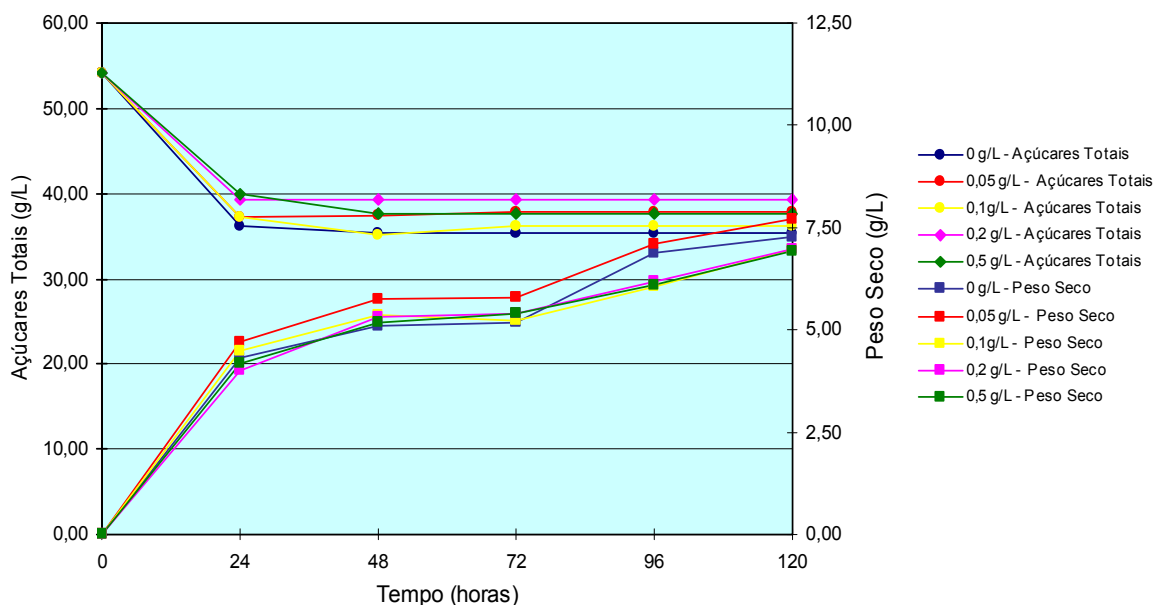
FIGURA 17 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA PELA LEVEDURA *Sacharomyces cerevisiae* NRRL YB 2293 COM ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE $ZnSO_4$ AO MEIO DE CULTIVO



É possível observar na figura 18 que a cepa de levedura *Komagataella (Pichia) pastoris* NRRL Y1603 apresentou um comportamento bastante peculiar: ela não foi capaz de metabolizar todos os açúcares presentes no meio de cultivo, consumindo

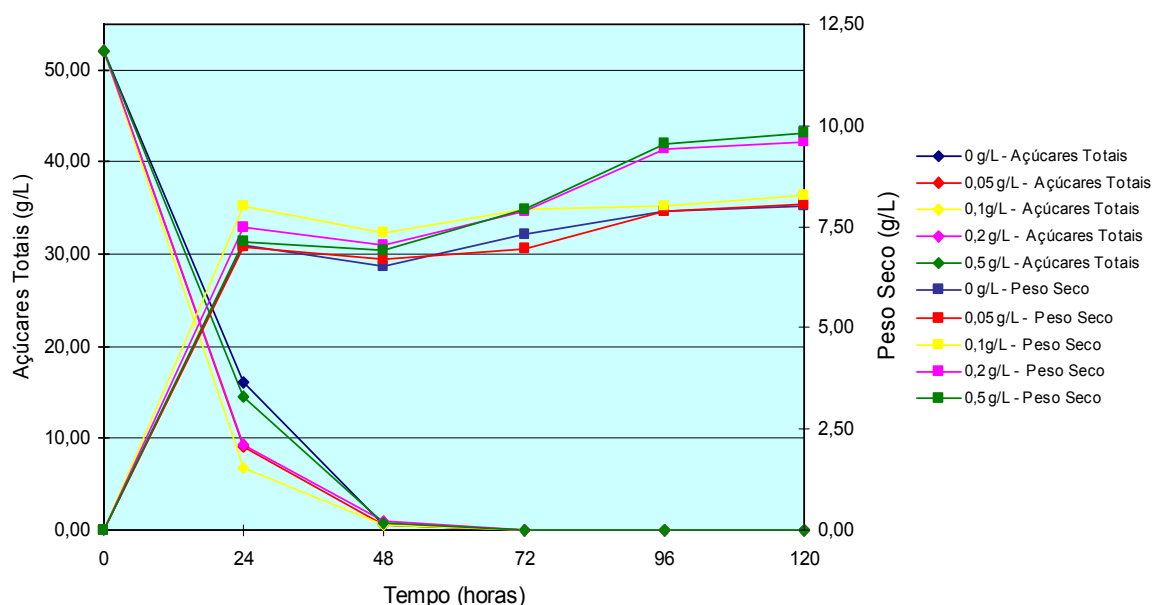
apenas cerca de 30% dos açúcares disponíveis. Isto pode ser justificado pelo fato de esta espécie não possuir a habilidade de fermentar o açúcar sacarose, consumindo apenas a glicose presente no meio de cultivo nos testes realizados (KURZMAN e FELL, 1998). O crescimento celular foi influenciado pelo baixo consumo de açúcares presentes no meio do microrganismo: a maior concentração de biomassa produzida por esta levedura foi de 7,72 g/L, no tempo de 120 horas, em um meio com concentração de 0,05 g/L de ZnSO_4 .

FIGURA 18 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA PELA LEVEDURA *Komagataella (Pichia) pastoris* NRRL Y 1603 COM ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ZnSO_4 AO MEIO DE CULTIVO



A cepa *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y27063 apresentou uma velocidade de metabolização dos açúcares totais presentes no meio de cultivo mais lenta que as demais cepas: as concentrações atingiram valores próximos a 0 com 48 horas de cultivo. Além disso, a velocidade de crescimento celular também se apresentou menor nesta cepa, sendo que a maior concentração de biomassa – 9,83 g/L – foi alcançada com 120 horas de cultivo, em meio contendo 0,5 g/L de ZnSO_4 . Não foi observada influência negativa do zinco sob o crescimento celular (ver figura 19).

FIGURA 19 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA PELA LEVEDURA *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 COM ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ZnSO_4 AO MEIO DE CULTIVO



Logo, a cepa de levedura selecionada para os testes posteriores de produção de biomassa rica em zinco orgânico foi a *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063, pois ela apresentou a maior retenção deste metal em sua célula (6.820 mg/kg) entre todas as cepas testadas. O valor da concentração de ZnSO_4 no meio de cultivo pode ser elevado nos próximos testes com a cepa *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063, já que ele não inibe seu crescimento celular.

4.3 TESTE DO ACÚMULO DO ZINCO X TEMPO DE CULTIVO

Neste experimento avaliou-se, em um cultivo celular de 120 horas, o tempo em que ocorria o maior acúmulo de zinco pela biomassa da levedura. A cepa utilizada foi a *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063, que reteve em sua biomassa a maior concentração de zinco, conforme detectado em testes realizados no item 4.2.

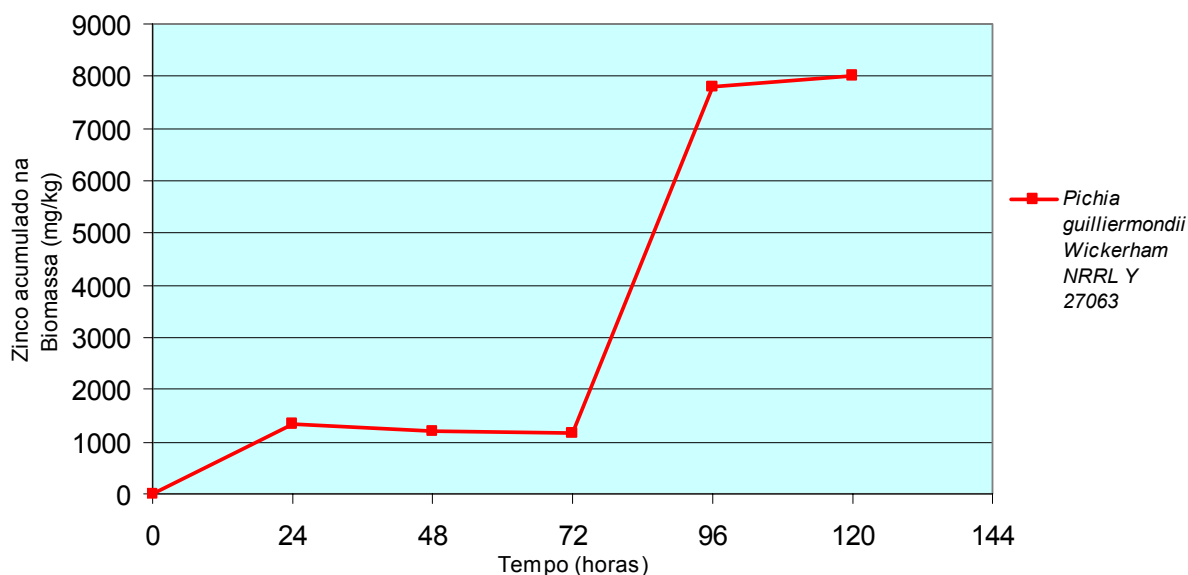
O meio de cultivo utilizado foi o mesmo utilizado no teste de seleção de cepas (item 4.2). A concentração de ZnSO_4 adicionada no meio de cultivo foi fixada em 0,5 g/L, visto que a cepa selecionada *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 demonstrou boa resistência a altas concentrações de zinco no meio de cultivo nos

experimentos realizados no item 4.2. Os tempos de crescimento estudados foram: 24, 48, 72, 96, e 120 horas.

Observou-se que até 72 horas de cultivo, a cepa *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 permaneceu com uma baixa taxa de acúmulo de zinco em sua biomassa. Porém, após este período, o acúmulo do zinco pelas células passou a aumentar, atingindo a concentração de 7.997 mg/kg de peso seco de biomassa produzida em 120 horas de cultivo (ver figura 20).

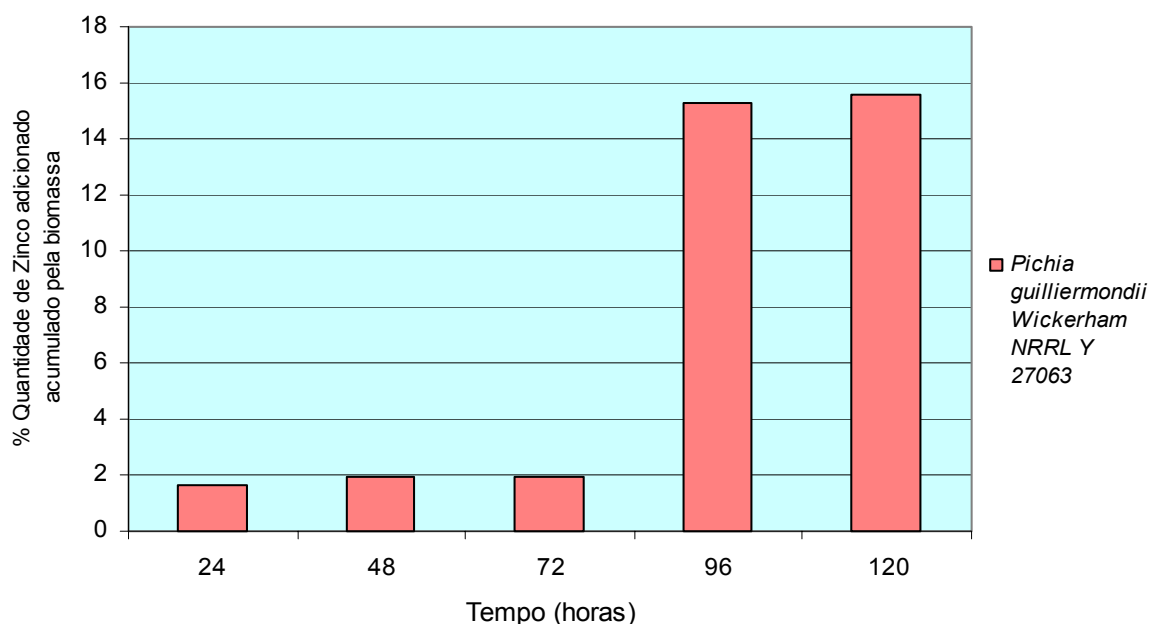
O período de acúmulo de zinco pela biomassa até 72 horas poderia ser caracterizado com a presença do mecanismo de biosorção ou captura passiva, enquanto que o período seguinte a este poderia apresentar a presença de tanto o mecanismo de biosorção, como também o de absorção, ou captura ativa. Porém isto não pode ser afirmado enquanto não forem elaboradas as metodologias para a separação e quantificação das diferentes espécies de zinco presentes na biomassa produzida. Estas metodologias serão desenvolvidas posteriormente no item 4.6.

FIGURA 20 – ZINCO ACUMULADO NA BIOMASSA PRODUZIDA EM RELAÇÃO AO TEMPO DE CULTIVO



Ao avaliar-se a porcentagem do zinco presente no meio de cultivo que foi acumulada pelas cepas estudadas, a cepa *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 atingiu 15,57% de retenção deste metal na biomassa, após 120 horas de cultivo, conforme a figura 21.

FIGURA 21 – PORCENTAGEM DE $ZnSO_4$ ADICIONADO AO MEIO DE CULTIVO QUE FOI EFETIVAMENTE ACUMULADO PELA BIOMASSA PRODUZIDA AO LONGO DO TEMPO DE CULTIVO



Logo, entre os tempos de cultivo estudados, a concentração máxima de zinco encontrada na biomassa foi ocorreu no tempo de 120 horas. Este tempo de cultivo será utilizado nos próximos testes como tempo máximo, porém uma cinética do cultivo deve ser realizada posteriormente, com uma duração maior de tempo, para avaliar-se a necessidade do aumento do mesmo durante o cultivo.

4.4 TESTE DA ADAPTAÇÃO DA CEPA DE *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y27063 EM MEIO CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ZINCO

Neste experimento foi avaliada a capacidade de armazenamento de zinco da levedura *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 adaptada ao zinco, e da mesma levedura não adaptada a este metal.

A cepa adaptada foi inoculada inicialmente em um tubo de ensaio com 10 mL de meio YM líquido, com concentração de 0,05 g/L de $ZnSO_4$. Após ser atingida a concentração na ordem de 1×10^7 a 1×10^8 células/mL neste inóculo, verificada através de método descrito no item 3.14.2.1, 10% do volume deste inóculo foi transferido para outro tubo de ensaio, contendo o meio YM líquido na concentração

de 0,1 g/L de ZnSO_4 . O aumento progressivo da concentração do metal no meio de cultivo YM líquido foi realizado conforme descrito acima, nas concentrações 0,2 g/L e 0,5 g/L.

O meio de cultivo utilizado em todos os testes foi o mesmo utilizado nos testes de seleção de cepas (item 4.2) e determinação do tempo de cultivo, nas mesmas condições de cultivo.

Com o intuito de avaliar se o método de Semeadura é eficiente no aumento da capacidade de acúmulo do metal zinco em leveduras, várias características foram acompanhadas. Elas foram: o número de células viáveis/mL do meio de cultivo, a morfologia das células em microscópio óptico, além da quantidade acumulada de zinco pela biomassa e o peso seco da biomassa produzida.

O número de células viáveis/mL inoculadas no tempo 0 horas nos experimentos com células adaptadas da levedura foi de $1,07 \times 10^7$, enquanto que nos testes com células não adaptadas esta taxa foi de $1,09 \times 10^7$ células viáveis/mL.

Nas figuras 22 e 23, é possível observar que as células não adaptadas ao zinco deste microrganismo atingiram concentrações superiores de células viáveis/ mL de meio do que as células da mesma levedura adaptadas ao zinco. Este fato ocorreu especialmente nos testes com adição de 0,05; 0,1 e 0,2 g/L de ZnSO_4 ao meio. A concentração celular máxima de células não adaptadas foi de $1,15 \times 10^9$ células/ mL de meio de cultivo, no teste com adição de 0,05 g/L de ZnSO_4 , após 54 horas de cultivo. Em concentrações iguais ou acima de 0,5 g/L, tanto nos testes com células não adaptadas, como os com células adaptadas, foi percebida uma diminuição significativa na concentração de células viáveis no meio de cultivo.

Na figura 22 pode-se visualizar que a viabilidade das células não adaptadas começa a se estabilizar após 60 horas de cultivo, o que coincide com o tempo onde se inicia um maior acúmulo de zinco. Pode existir uma correlação entre estes dois processos, onde o mecanismo de acúmulo do zinco existente poderia ser aumentado após um período de produção intensa de células viáveis no cultivo celular.

FIGURA 22 - NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS/ ML DE MEIO DE CULTIVO NOS TESTES UTILIZANDO A CEPA NÃO ADAPTADA DE *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063

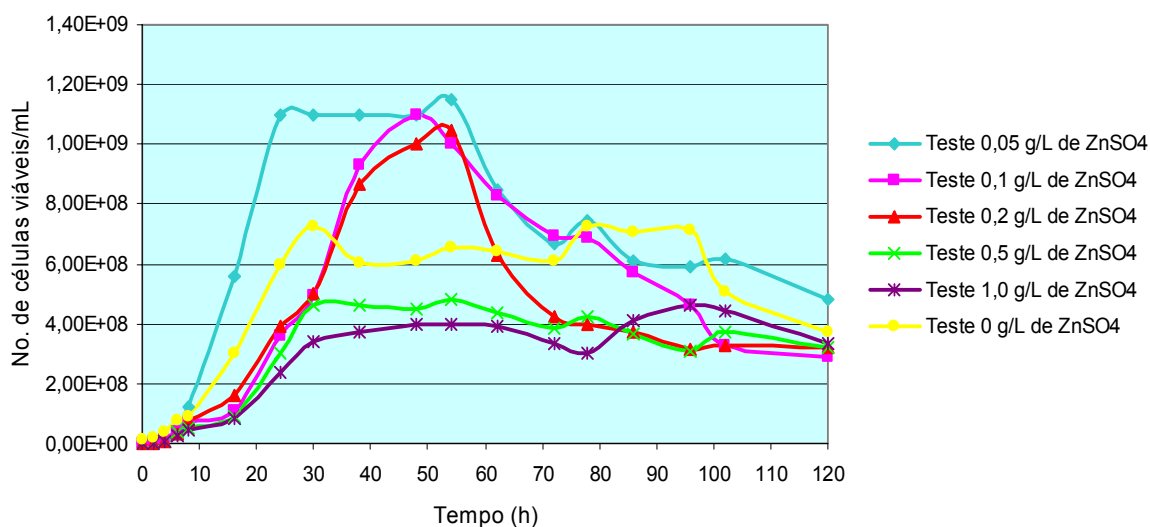
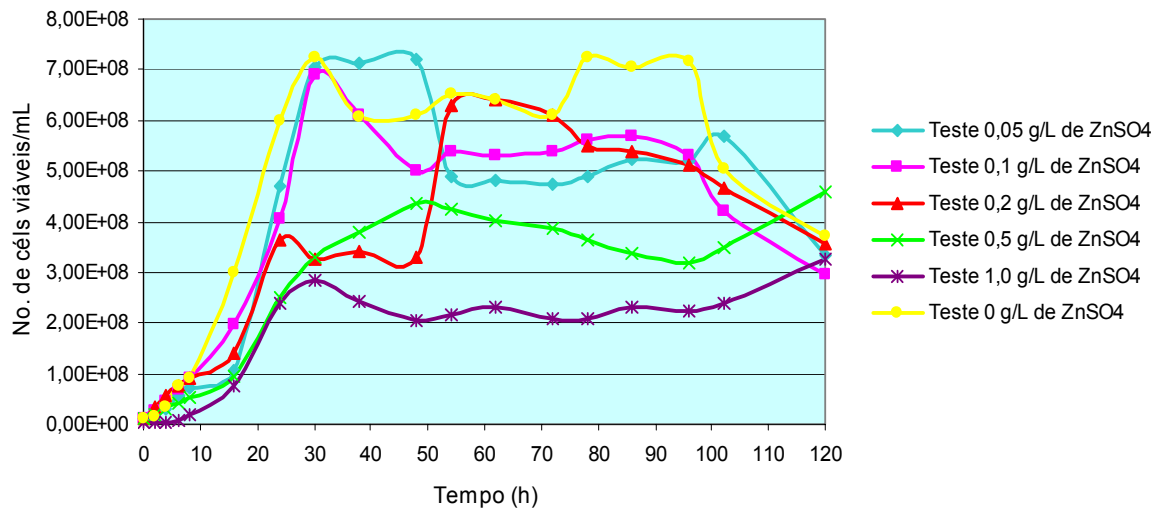


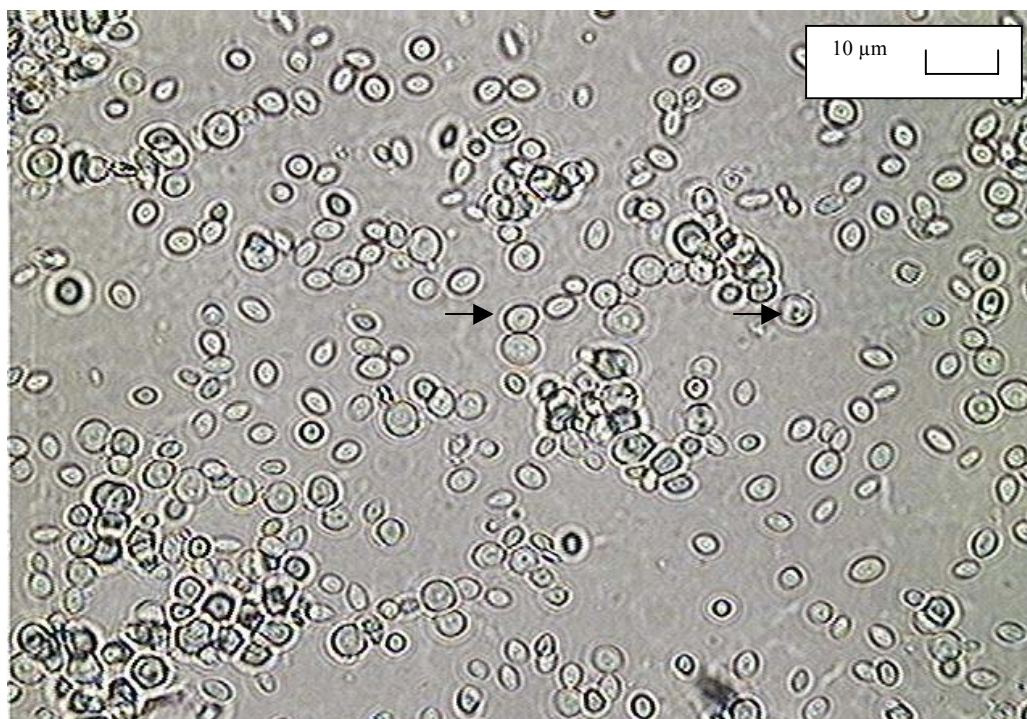
FIGURA 23 - NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS/ ML DE MEIO DE CULTIVO NOS TESTES UTILIZANDO A CEPA ADAPTADA DE *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063



DE SILÓNIZ et al. (2002), ao fermentar a *P. guilliermondii* com cobre, a fim de obter uma biomassa enriquecida com este metal, observaram que as células não adaptadas ao cobre possuíam taxas de crescimento menores do que as células adaptadas, quando a concentração deste metal era aumentada no meio de cultivo. Além disso, perceberam que a fase *lag* das células não adaptadas em altas concentrações de cobre apresentou-se mais longa.

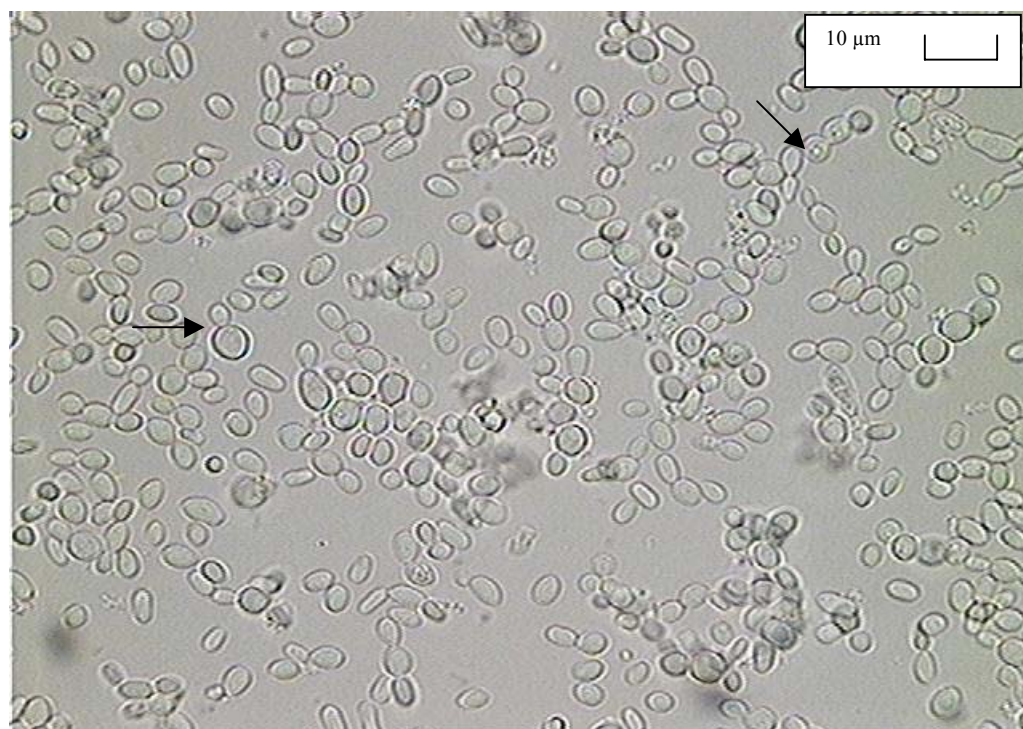
Nas imagens visualizadas em microscópio óptico, em aumento de 100 vezes, ao longo do tempo de cultivo, observou-se que as células não adaptadas ao zinco apresentaram estruturas semelhantes a vacúolos, que são responsáveis pelo acúmulo de metais. A frequência de aparecimento destes vacúolos está diretamente relacionada com a concentração do metal adicionada ao meio de cultivo. Quando avaliada a influência do tempo de cultivo no surgimento dos vacúolos, foi percebido que a presença destas organelas está diretamente relacionada com o tempo. Ou seja, quanto maior o tempo de cultivo, maior a quantidade de vacúolos presentes. Todos os testes realizados com células não adaptadas adicionados de ZnSO_4 apresentaram vacúolos em grande quantidade após 120 horas de cultivo. Na figura 24 é possível visualizar uma foto tirada no microscópio óptico do teste com células não adaptadas ao ZnSO_4 de *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063, com adição de 1,0 g/L de meio de cultivo, após 120 horas de cultivo.

FIGURA 24 – VISUALIZAÇÃO EM MICROSCÓPIO ÓPTICO DE CÉLULAS NÃO ADAPTADAS DE *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 AO ZINCO, APÓS 120 HORAS, COM ADIÇÃO DE 1,0 g/L DE ZnSO_4 AO MEIO DE CULTIVO (EXAME A FRESCO – AUMENTO DE 100X)



Já os testes realizados com células adaptadas ao zinco apresentaram células sem a presença aparente ou com muito poucos vacúolos, sendo que os raros presentes surgiram após longo tempo de cultivo – após 56 horas – e em testes com adição de concentrações acima de 0,1 g/L de ZnSO_4 no meio de cultivo. As células se mostraram mais alongadas, quando comparadas com as não adaptadas. A figura 25 mostra o aspecto das células de *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 adaptadas ao zinco, com adição de ZnSO_4 de 1,0 g/L no meio de cultivo, após 120 horas de cultivo.

FIGURA 25 – VISUALIZAÇÃO EM MICROSCÓPIO ÓPTICO DE CÉLULAS ADAPTADAS DE *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 AO ZINCO, APÓS 120 HORAS, COM ADIÇÃO DE 1,0 g/L DE ZnSO_4 AO MEIO DE CULTIVO (EXAME A FRESCO – AUMENTO DE 100X)

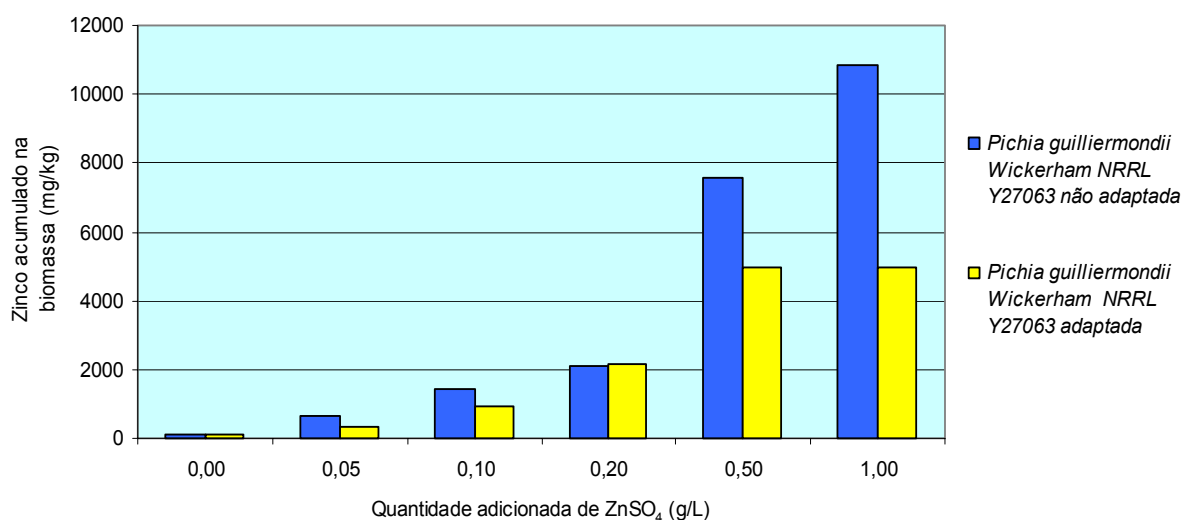


Mudanças morfológicas em resposta a metais pesados foram citadas pela literatura, como aquelas envolvendo estruturas de reprodução ou o comprimento de micélio em fungos filamentosos, ou a inibição do desenvolvimento do micélio. Quando DE SILÓNIZ et al. (2002) compararam a morfologia das células controle sem adaptação com a das adaptadas, várias diferenças foram percebidas. As células não adaptadas, ao serem fermentadas em meio de cultivo com presença de

cobre, formaram uma forma filamentosa, sem a forma unicelular. Além disso, foi observada uma mudança para a coloração verde das culturas. Já as células adaptadas não apresentaram a formação de filamentos, e eram apenas unicelulares, quando cultivadas em meio com cobre.

Na figura 26, é possível visualizar a capacidade de acúmulo de zinco das células adaptadas e não adaptadas da *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063. Este último grupo obteve concentrações bem maiores de acúmulo de zinco do que as células adaptadas a este metal. O valor máximo obtido pelos testes com células não adaptadas foi de 10.848 mg/kg de peso seco de biomassa, no teste com adição de ZnSO_4 de 1,0 g/L de meio de cultivo. Já nos testes realizados com as células da levedura adaptadas ao zinco, o valor máximo alcançado foi de 4.988 mg/kg, no teste com adição de ZnSO_4 de 0,5 g/L de meio de cultivo.

FIGURA 26 – QUANTIDADE DE ZnSO_4 ADICIONADA AO MEIO DE CULTIVO VERSUS A QUANTIDADE ACUMULADA DE ZINCO PELAS CEPAS NÃO ADAPTADAS E ADAPTADA DE *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063



Os dados obtidos nos experimentos são diferentes dos resultados encontrados por DONMEZ e AKSU (2001), que obtiveram uma capacidade específica de retenção do metal e a sua remoção (%) pelas células adaptadas de *Candida* spp maior do que a das não adaptadas em todas as concentrações testadas.

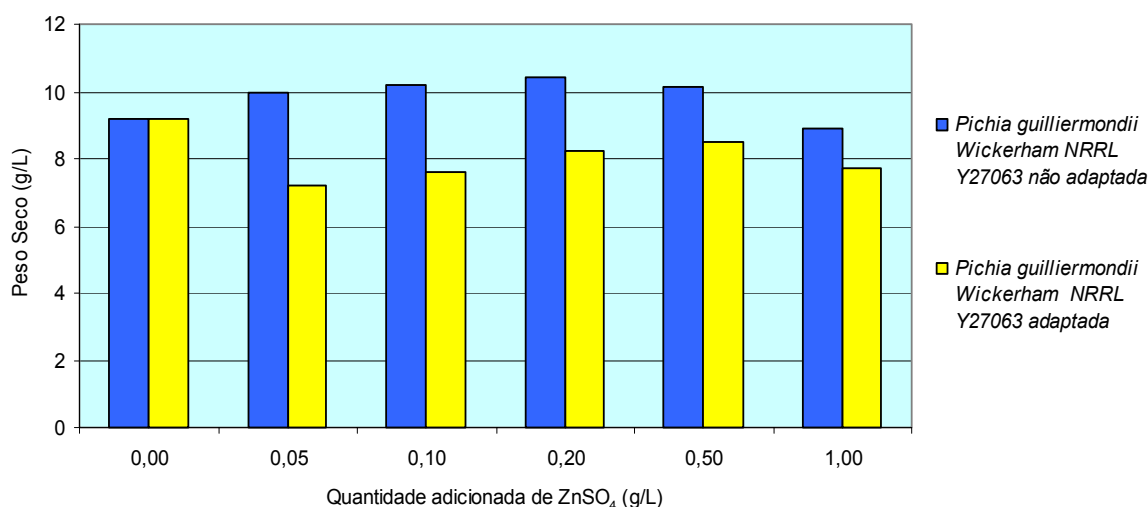
Já PONCE DE LEÓN et al., 2002, ao enriquecer a levedura *S. cerevisiae* com selenito de sódio, percebeu que o uso da técnica de semeadura das células antes

da inoculação inibiu o crescimento celular, contanto, não influenciou na concentração de selênio na célula.

Em um estudo com enriquecimento de cromo em leveduras, a semeadura permitiu uma maior retenção do cromo nas células tratadas do que nas não tratadas (HEGOCZKI et al., 1997).

O peso seco obtido de biomassa também foi influenciado pelo tratamento de semeadura. Os tratamentos com células não adaptadas obtiveram maior produção de biomassa de levedura em todas as concentrações de zinco adicionadas ao meio de cultivo – sendo a melhor produção ocorreu no teste com adição de 0,2 g/L de ZnSO_4 , que foi de 10,45 g/L. Foi percebida uma diminuição no valor de peso seco do teste com células não adaptadas com adição de ZnSO_4 de 1,0 g/L de meio de cultivo, conforme a figura 27.

FIGURA 27 – QUANTIDADE DE ZnSO_4 ADICIONADA AO MEIO DE CULTIVO VERSUS O PESO SECO OBTIDO DE BIOMASSA DAS CEPAS NÃO ADAPTADA E ADAPTADA DE *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063



As células não adaptadas de *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 acumularam uma maior concentração de zinco em sua biomassa (10.848 mg/kg em presença de 1,0 g/L de ZnSO_4), além de obterem um maior peso seco em todas as concentrações de ZnSO_4 testadas, e uma maior viabilidade celular em todos os tempos avaliados. Esta condição deve ser mantida nos testes posteriores.

O aumento do acúmulo de zinco pela biomassa, quando comparado com o teste de seleção de cepas (6.820 mg/kg) foi de cerca de 59%.

4.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES QUÍMICAS E FÍSICAS DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM ZINCO ORGÂNICO

4.5.1 Fonte de carbono

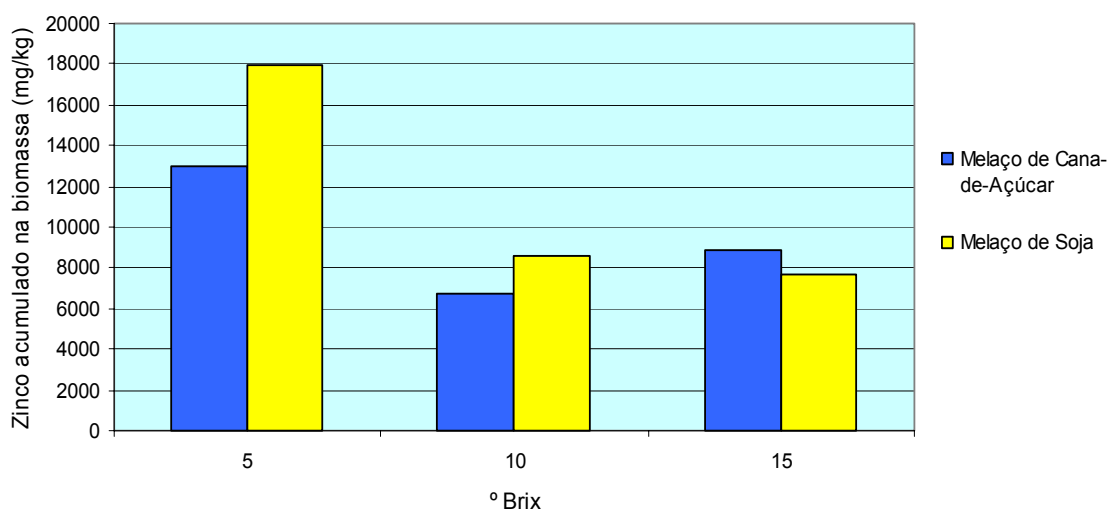
Neste experimento foi avaliada a melhor fonte de carbono a ser utilizada pela cepa *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 não adaptada durante a produção de biomassa rica em zinco. Dois resíduos agrícolas, utilizados como fontes de carbono, foram testados: melaço de cana-de-açúcar e melaço de soja. Os melaços de cana-de-açúcar e de soja foram adicionados ao meio de cultivo nas concentrações 5, 10 e 15 °Brix.

A cepa não adaptada ao zinco de *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 foi utilizada nos testes, pois obteve melhores resultados de acúmulo de zinco no teste descrito no item 3.10.1.

Estudou-se o efeito das fontes de carbono sobre a quantidade de zinco acumulada na biomassa obtida. Percebeu-se que o aumento na concentração de °Brix, tanto nos testes realizados com melaço de soja, como nos utilizando melaço de cana-de-açúcar, influenciou negativamente a retenção do metal na biomassa da levedura. Isto pode ser explicado por uma alta concentração de sólidos no meio de cultivo interferir no mecanismo de transporte do metal presente no meio para a célula, inibindo assim seu acúmulo.

Os testes realizados tanto com 5 °Brix de melaço de soja, como com 5 °Brix de melaço de cana-de-açúcar obtiveram os melhores resultados de acúmulo de zinco, com 17.956 e 13.028 mg/kg, respectivamente (vide figura 28).

FIGURA 28 – QUANTIDADE DE ZINCO TOTAL ACUMULADA PELA BIOMASSA PRODUZIDA VERSUS °BRIX DAS FONTES DE CARBONO ADICIONADAS



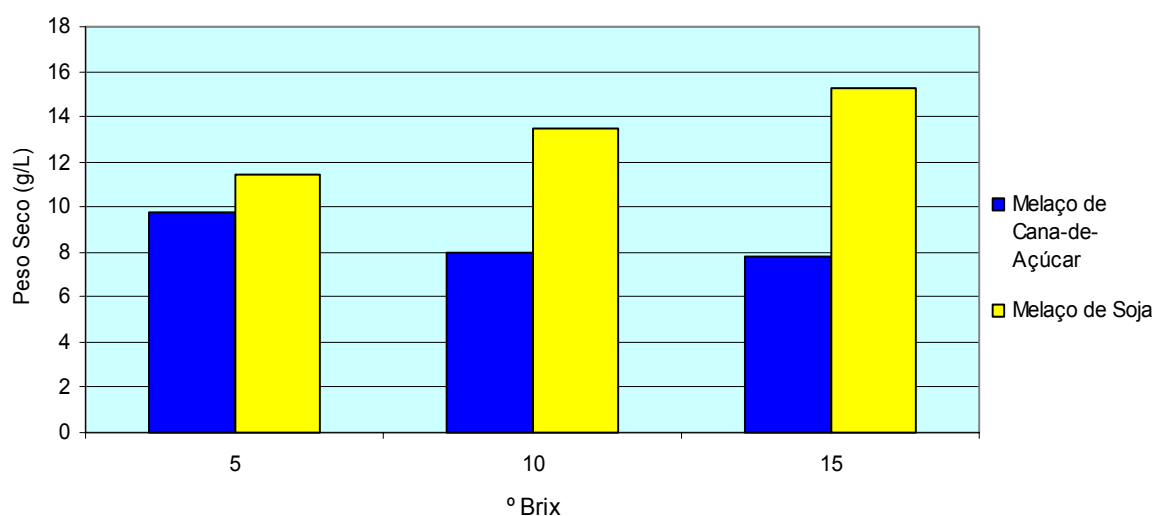
É possível observar, quando levada em conta a quantidade de zinco acumulada pela biomassa produzida, que o melaço de soja é uma melhor fonte de carbono que o melaço de cana-de-açúcar. Isto pode ser justificado pelo maior teor de proteína presente nesta matéria-prima, que servirá como fonte de nitrogênio orgânico para o microrganismo produzir aminoácidos em sua célula. Os aminoácidos irão formar ligações com os íons Zn^{2+} , produzindo o zinco orgânico. A adição de extrato de levedura com fonte de nitrogênio orgânico é importante para aumentar o acúmulo de zinco pela levedura, porém por possuir alto custo, tem sua adição ao meio de cultivo restrita.

Não existem relatos na literatura de uso de melaço de cana-de-açúcar e de melaço de soja na produção de biomassa de levedura rica em zinco, utilizando-se a fermentação líquida. STEHLIK-THOMAS et al. (1997, 2004) utilizaram o melaço de beterraba em seus estudos, resíduo este comum na Europa, no cultivo de *S. cerevisiae* para a produção de biomassa rica em zinco, aplicando este tipo de fermentação. O uso destes subprodutos agroalimentares no meio de cultivo é de extrema importância, pois utiliza substratos de baixo custo para produzir uma substância com alto valor agregado.

Ao estudar-se qual a influência de diferentes fontes e concentrações de carbono sobre a produção de biomassa pela levedura *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063, observou-se que os testes realizados com melaço de

soja alcançaram produções de biomassa melhores (11,47; 13,44 e 15,26 g/L, para os testes com 5, 10 e 15 °Brix, respectivamente) do que os realizados com melaço de cana-de-açúcar (9,76; 8,00 e 7,76 g/L, para os testes com 5, 10 e 15 °Brix, respectivamente). O melhor peso seco obtido de biomassa foi no teste com meio de cultivo a 15° Brix de melaço de soja, com produção de 15,26 g/L (ver figura 29).

FIGURA 29 – PESO SECO DA BIOMASSA PRODUZIDA VERSUS °BRIX DAS FONTES DE CARBONO ADICIONADAS



A maior produtividade de biomassa utilizando o melaço de soja pode ser justificada por uma proporção C:N mais equilibrada existente no meio para o microrganismo, o que gera maior crescimento celular, e conseqüentemente, maior peso seco. Conforme sua concentração foi aumentada no meio, forneceu-se para o microrganismo maiores quantidades de fonte de carbono e de nitrogênio orgânico, ambas em uma proporção mais equilibrada.

As fontes de carbono Melaço de soja a 5°Brix e Melaço de Cana-de-Açúcar a 5°Brix permitiram um maior acúmulo de zinco pela biomassa produzida, por possuírem uma menor concentração de sólidos em sua composição. Elas devem ser exploradas nos próximos testes.

O aumento do acúmulo de zinco pela biomassa, quando comparada a maior concentração de acúmulo de zinco obtida neste teste com o valor obtido no teste de seleção de cepas (6.820 mg/kg), foi de cerca de 163 %.

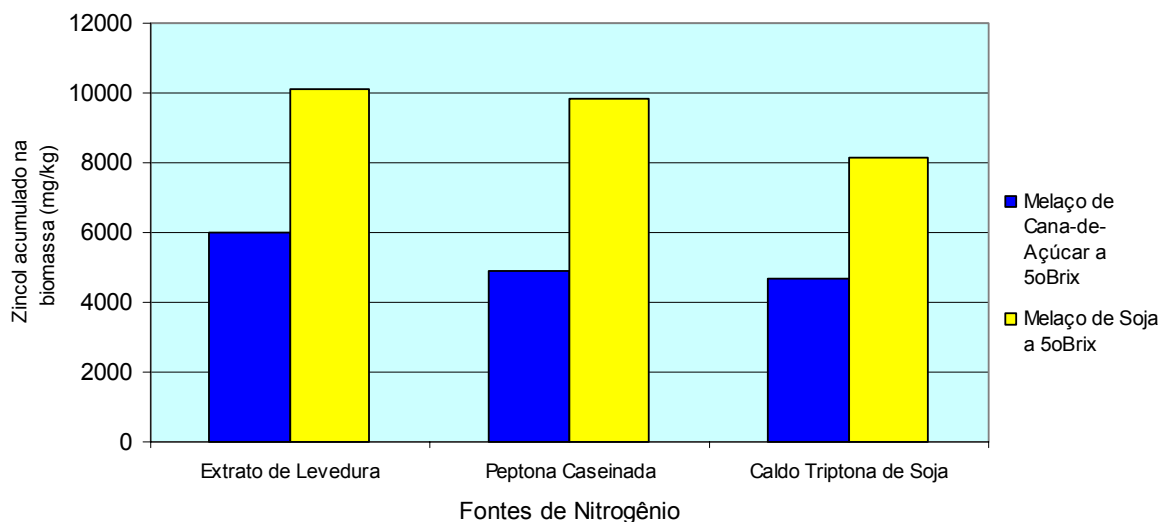
4.5.2 Fonte de nitrogênio orgânico

Neste experimento foram testadas três matérias-primas como o intuito de encontrar a melhor fonte de nitrogênio orgânico para o acúmulo do zinco pela cepa *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 não adaptada. Foram testadas as seguintes fontes de nitrogênio: Extrato de Levedura (10,0 g/L), Peptona Caseinada (8,0 g/L), e Caldo Triptona de Soja (8,0 g/L), todas estas fontes ricas de proteínas.

Também foram testados novamente os dois resíduos industriais que são fonte de carbono - melaço de cana-de-açúcar e melaço de soja – sendo ambos utilizados na concentração de 5° Brix, concentração esta onde foram obtidos os melhores resultados de acúmulo de zinco pela biomassa no teste realizado no item 4.5.1.

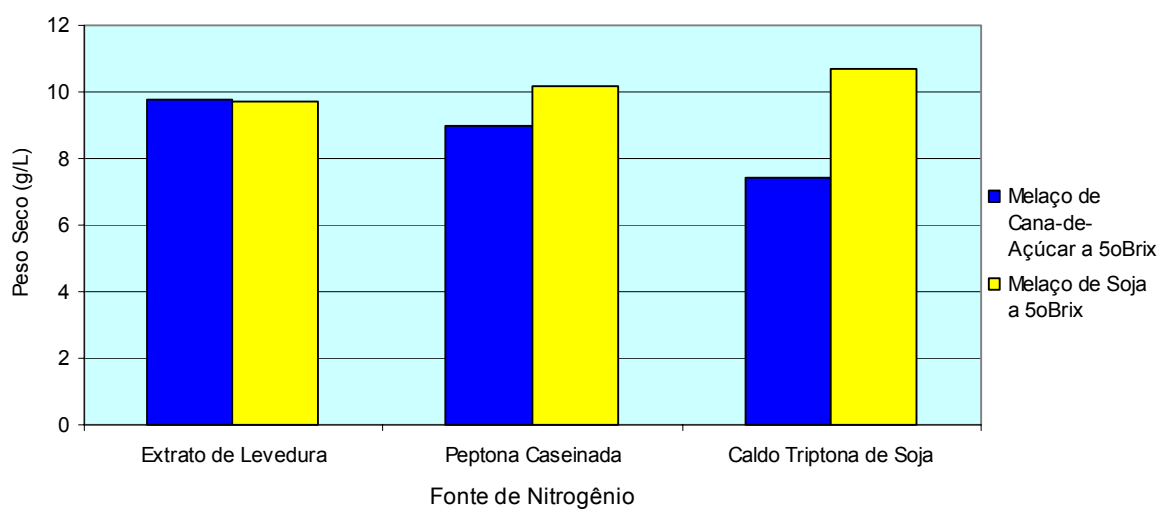
Quando avaliada a quantidade de zinco acumulada pelas biomassas obtidas nos testes, os melhores resultados obtidos foram nos testes utilizando 5 °Brix de melaço de soja com fonte de carbono, e a maior concentração alcançada foi de 10.128 mg/kg de biomassa, com a adição de extrato de levedura ao meio de cultivo (ver figura 30). Isto pode ser devido ao fato de esta fonte de nitrogênio poder conter maior quantidade dos aminoácidos que se ligam mais facilmente ao zinco, como os aminoácidos sulfurados e a glicina (SPEARS, 1996; SPEARS, 1989; KESSLER et al., 2003). Estas moléculas são os principais ligantes do zinco na célula, formando-se assim o zinco orgânico. Porém para poder afirmar isto com certeza seria necessário realizar uma análise da composição dos aminoácidos presentes em cada um dos ingredientes utilizados como fonte de nitrogênio orgânico.

FIGURA 30 – QUANTIDADE DE ZINCO ACUMULADA PELA BIOMASSA PRODUZIDA VERSUS A FONTE DE NITROGÊNIO ORGÂNICO ADICIONADA



Ao analisar-se a variável Peso Seco de biomassa produzida, a fonte de carbono melaço de soja, a 5^oBrix, alcançou melhores valores do que o melaço de cana-de-açúcar, também com o mesmo valor de ^oBrix, com exceção do extrato de levedura, onde a produção foi igual. A melhor fonte de nitrogênio orgânico sob esta condição foi o caldo triptona de soja, com 10,68 g de peso seco de biomassa produzida por litro de fermentado (ver figura 31).

FIGURA 31 - PESO SECO DA BIOMASSA PRODUZIDA VERSUS FONTE DE NITROGÊNIO ORGÂNICO ADICIONADA



As melhores condições encontradas nestes experimentos para a produção de biomassa rica em zinco orgânico foram de 5 °Brix para a fonte de carbono melaço de soja, e de 10 g/L para a fonte de nitrogênio orgânico Extrato de Levedura.

4.5.3 Delineamento experimental

4.5.3.1 Planejamento Fatorial Fracionário 2⁸⁻⁴

Neste experimento foi aplicado o planejamento fatorial fracionário como ferramenta na seleção das variáveis significativas na produção de cultivo da levedura *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 não adaptada ao zinco. Para a otimização das condições de produção de biomassa rica em zinco foi utilizado o planejamento fatorial fracionário 2⁸⁻⁴, permitindo o estudo da influência de 8 variáveis independentes com 16 ensaios.

Foram avaliadas oito variáveis independentes (concentração de ZnSO₄, concentração de MgSO₄, concentração de KH₂PO₄, concentração de Extrato de Levedura; °Brix adicionados da fonte de carbono (na forma de melaço de soja), concentração de Fe₂(SO₄)₃, tempo de adição da solução de ZnSO₄ no fermentado, e pH), com relação à variável dependente concentração de zinco acumulado pela biomassa.

BRADY e DUNCAN (1994) demonstraram que a captura de íons divalentes pela *S. cerevisiae* é significativamente reduzida abaixo do pH 5,0. Um baixo pH pode aumentar a mobilidade do metal, enquanto que em pHs próximos ou acima da neutralidade, existe a tendência de formação de óxidos insolúveis, hidróxidos e carbonatos. Logo, as variáveis independentes pH e concentração de KH₂PO₄ foram avaliadas.

As condições nutricionais do meio de cultivo influenciam na capacidade de biosorção de metais pesados do *S. cerevisiae*. ENGL e KUNZ (1995) descobriram que a maior adsorção do zinco à biomassa de *S. cerevisiae* ocorre quando esta é obtida através de cultivo com meio suplementado com fosfato, o qual gerou uma alta seletividade para este metal. O metal liga-se ao ligante fósforo presente na molécula de fosfato. Logo, foi testado o sal KH₂PO₄ nos experimentos.

As concentração de MgSO_4 e de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ foram avaliadas, porque existem poucos relatos na literatura de estudos sobre a relação entre os diferentes mecanismos e/ou níveis relativos de captura de metal ou toxicidade com as características químicas dos metais estudados. A concentração de MgSO_4 foi aumentada em 10 vezes por motivo de relato em literatura de que o magnésio tem como função ativar diversas enzimas na glicólise e membrana ATPases, além de regular o nível intracelular de metais. DE OLIVEIRA (2006) utilizou 4,0 g/L de MgSO_4 no meio de cultivo para produção de biomassa rica em organoselênio. Já a adição de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ é justificada por resultados obtidos pela patente US 4.764.633 (ANDERSON e ANDERSON, 1998), que afirma que o íon férrico, na presença do ZnSO_4 , auxilia na solubilização do sal de zinco, ao mesmo tempo que aumenta a formação de complexos entre o ZnSO_4 e os aminoácidos presentes no meio.

Já as variáveis Concentração de Extrato de Levedura e °Brix adicionados do melaço de soja foram testadas, pois a concentração de nitrogênio orgânico presente nestas matérias primas pode influenciar positivamente o acúmulo de zinco.

Os resultados obtidos para a variável de resposta, concentração de zinco na biomassa, assim como os valores reais dos fatores em cada ensaio deste experimento estão na Tabela 12.

TABELA 12 – PLANEJAMENTO FRACIONÁRIO 2⁸⁻⁴ PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM ZINCO ORGÂNICO

Ensaio	Fatores experimentais								Variável de resposta
	1 (g/L)	2 (g/L)	3 (g/L)	4 (g/L)	5 (°Brix)	6 (g/L)	7 (h)	8	Zinco (mg/kg)
1 - 17	2,5	5,0	10,0	10,0	10	0,1	24	7,0	9.248
2 - 18	2,5	5,0	10,0	5,0	5	0,0	24	6,0	15.659
3 - 19	2,5	5,0	5,0	10,0	5	0,0	0	7,0	16.940
4 - 20	2,5	5,0	5,0	5,0	10	0,1	0	6,0	12.948
5 - 21	2,5	0,5	10,0	10,0	5	0,1	0	6,0	24.982
6 - 22	2,5	0,5	10,0	5,0	10	0,0	0	7,0	10.295
7 - 23	2,5	0,5	5,0	10,0	10	0,0	24	6,0	7.498
8 - 24	2,5	0,5	5,0	5,0	5	0,1	24	7,0	22.742
9 - 25	1,0	5,0	10,0	10,0	10	0,0	0	6,0	2.385
10 - 26	1,0	5,0	10,0	5,0	5	0,1	0	7,0	11.504
11 - 27	1,0	5,0	5,0	10,0	5	0,1	24	6,0	9.806
12 - 28	1,0	5,0	5,0	5,0	10	0,0	24	7,0	2.474
13 - 29	1,0	0,5	10,0	10,0	5	0,0	24	7,0	6.310
14 - 30	1,0	0,5	10,0	5,0	10	0,1	24	6,0	1.948
15 - 31	1,0	0,5	5,0	10,0	10	0,1	0	7,0	1.864
16 - 32	1,0	0,5	5,0	5,0	5	0,0	0	6,0	8.414

Observação: 1 = Concentração de ZnSO₄, 2= Concentração de Mg SO₄, 3= Concentração de KH₂PO₄, 4= Concentração de extrato de levedura, 5= °Brix, 6= Concentração de Fe₂(SO₄)₃, 7= tempo de adição da solução de ZnSO₄, 8= pH.

Na figura 32, tem-se o Diagrama de Pareto para as variáveis independentes estudadas. Ele apresenta a influência das variáveis independentes estudadas sobre a concentração de zinco acumulado na biomassa obtida, a um nível de significância de 95%. O fator concentração de ZnSO₄ gerou a maior tendência sobre a variável de resposta. O efeito linear do fator da concentração de Fe₂(SO₄)₃ também apresentou uma tendência positiva significativa, enquanto que os efeitos lineares dos fatores °Brix e tempo de adição da solução de ZnSO₄ apresentaram uma tendência significativa à diminuição do acúmulo deste metal pela biomassa.

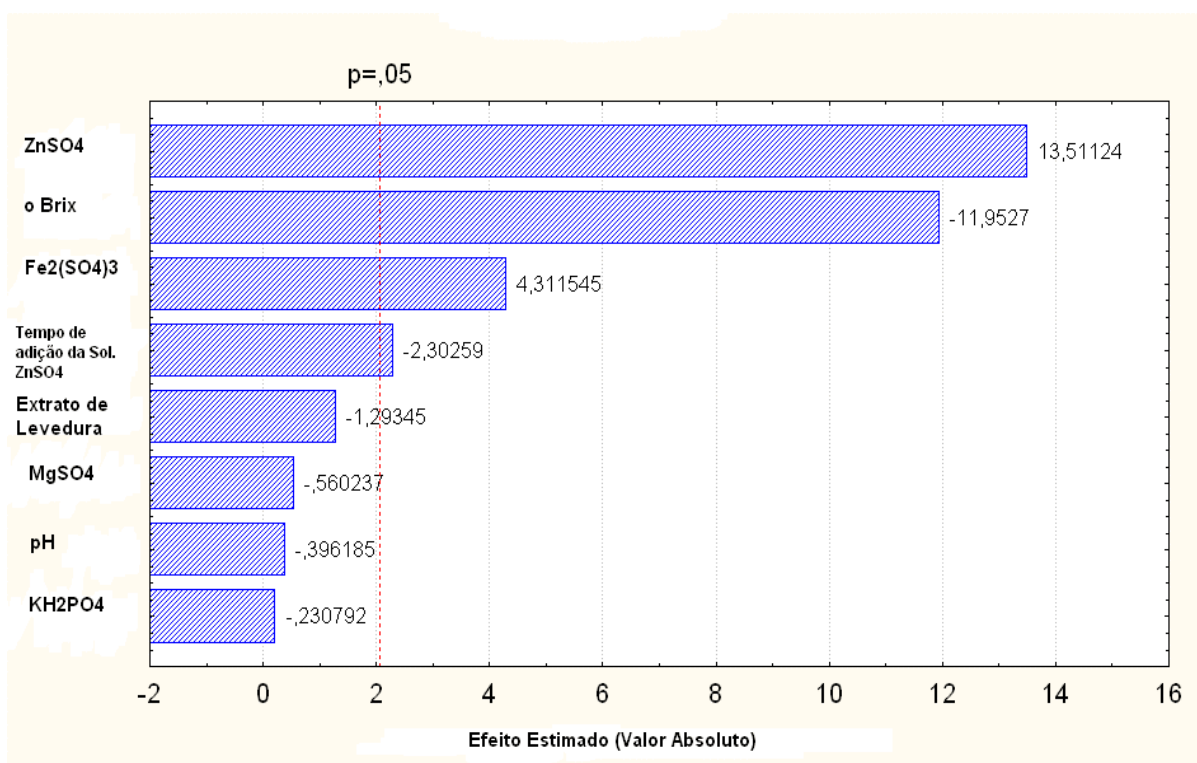
O acúmulo de metais por leveduras é influenciado por uma série de fatores, como as propriedades físico-químicas do metal; fisiologia da célula; e condições do ambiente, como pH e temperatura (STOLL e DUNCAN, 1996).

A tendência ao aumento de acúmulo do zinco do fator concentração de ZnSO₄ pode ser justificado por ter sido observado nos testes anteriores de que o acúmulo de zinco pela cepa *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 ser em torno de 10 a 15% da quantidade total de zinco presente no meio (testes 4.2 e 4.3). Logo, aumentando-se a concentração do metal no meio, aumenta-se diretamente a sua

concentração na biomassa produzida. Já o aumento de acúmulo produzido pelo fator concentração de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ pode ser justificado pela patente US 4.764.633, onde a adição de 0,1 g/L de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, na presença do sal de zinco na forma de sulfato, auxilia na solubilização deste sal, ao mesmo tempo que aumenta a formação de complexos entre o ZnSO_4 e os aminoácidos presentes no meio (ANDERSON e ANDERSON, 1998).

Para o teste de delineamento experimental posterior (item 4.5.3.2), as variáveis significativas devem ser ajustadas para seus valores mínimos ou máximos, dependendo da sua tendência sobre o acúmulo de zinco. Logo, a concentração máxima de zinco na biomassa pode ser obtida ajustando-se os fatores concentração de ZnSO_4 e concentração de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ nos seus níveis superiores. Entre os fatores que geraram uma tendência significativa à diminuição do acúmulo do zinco, a diminuição de °Brix na formulação não seria aconselhável, pois isto atuaria diretamente sobre o crescimento celular, diminuindo muito a produtividade da biomassa (conforme observado nos testes do item 4.5.1 – Fonte de Carbono). Já o tempo de adição da solução de ZnSO_4 não pode ser ainda mais diminuído, pois o menor tempo utilizado foi de 0 horas.

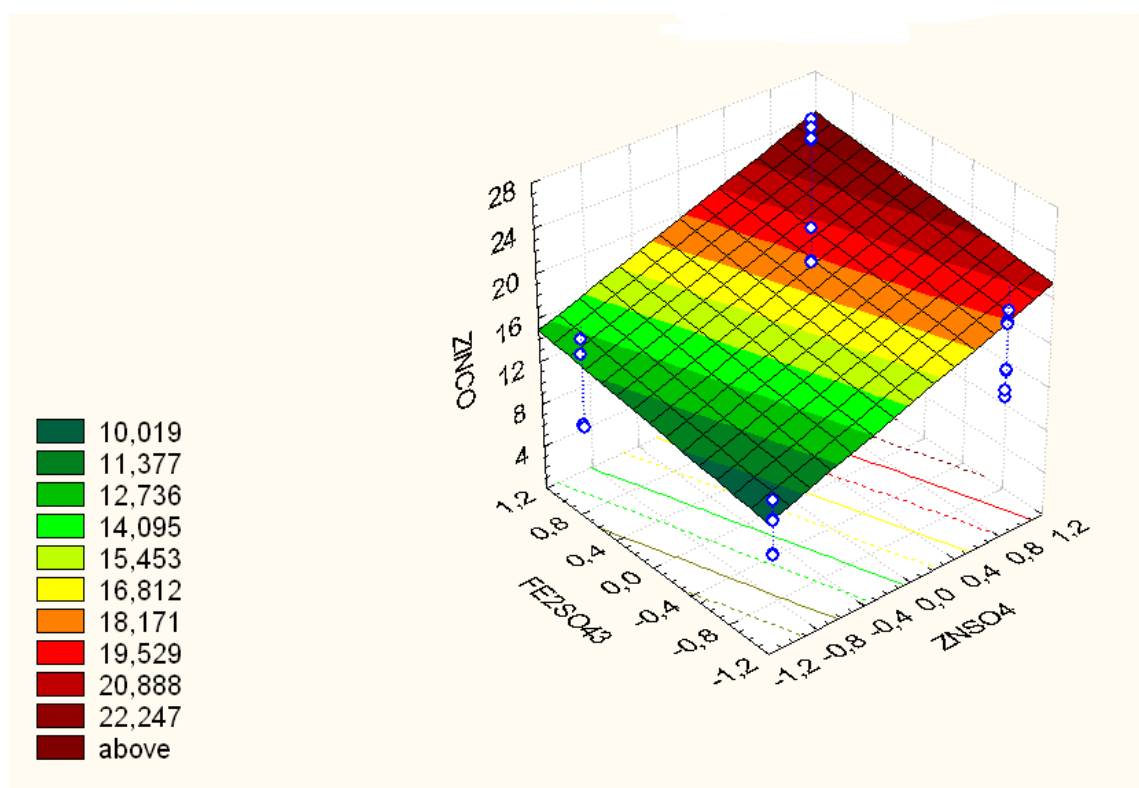
FIGURA 32 – GRÁFICO DIAGRAMA DE PARETO: INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE ZINCO ACUMULADO



A tendência significativa ao aumento do acúmulo de zinco do fator concentração de ZnSO₄ era esperado, pois nos testes anteriormente realizados foi observado que o aumento da concentração do zinco na biomassa produzida estava diretamente ligado com o aumento da concentração de ZnSO₄ no meio de cultivo.

A figura 33 mostra o gráfico de superfície de resposta da variável concentração de zinco na biomassa em função dos fatores concentração de ZnSO₄ e concentração de Fe₂(SO₄)₃. É possível observar no gráfico que quanto maiores as concentrações de ZnSO₄ e Fe₂(SO₄)₃, maior a quantidade de zinco acumulada pela biomassa.

FIGURA 33 – GRÁFICO SUPERFÍCIE DE RESPOSTA: INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES CONCENTRAÇÃO DE ZnSO_4 E CONCENTRAÇÃO DE $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE ZINCO ACUMULADO



O melhor resultado obtido de concentração de zinco total acumulado na biomassa produzida por *P. guilliermondii* Wickerham NRRL 27063 foi de 24.982 mg/kg, sob as seguintes condições: ZnSO_4 , 2,5 g/L; MgSO_4 , 0,5 g/L; KH_2PO_4 , 10,0 g/L; Extrato de levedura, 10,0 g/L; °Brix, 5°; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, 0,1 g/L; Tempo de adição da solução de ZnSO_4 , 0 horas; pH, 6,0.

4.5.3.2 Planejamento Fatorial Completo 3^2

Neste segundo delineamento, foi realizado um estudo da influência dos fatores concentração de ZnSO_4 e concentração de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ em níveis maiores que aqueles utilizados no primeiro delineamento, sobre a concentração de zinco acumulada na biomassa.

A concentração dos nutrientes no meio de cultivo foram as seguintes: MgSO_4 , 0,5 g/L; KH_2PO_4 , 5,0 g/L; Extrato de levedura, 5,0 g/L; °Brix, 5°; Tempo de adição da solução de ZnSO_4 , 0 horas; pH, 6,0.

A otimização foi efetuada através de um Planejamento Fatorial Completo 3^2 , sendo que as variáveis foram distribuídas em três níveis. Cada planejamento consistiu em 9 ensaios, sendo estes realizados em duplicata.

Os resultados obtidos para a variável de resposta, concentração de zinco na biomassa, assim como os valores reais dos fatores em cada ensaio deste experimento estão na Tabela 13.

TABELA 13 – PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 3^2 PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM ZINCO ORGÂNICO

Ensaio	Fatores experimentais		Variável de resposta
	Concentração de ZnSO_4 (g/L)	Concentração de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (g/L)	Zinco (mg/kg)
1 - 10	2,0	0,1	12.320
2 - 11	2,0	0,3	10.320
3 - 12	2,0	0,5	10.560
4 - 13	6,0	0,1	49.940
5 - 14	6,0	0,3	47.420
6 - 15	6,0	0,5	50.390
7 - 16	10,0	0,1	75.090
8 - 17	10,0	0,3	74.020
9 - 18	10,0	0,5	61.910

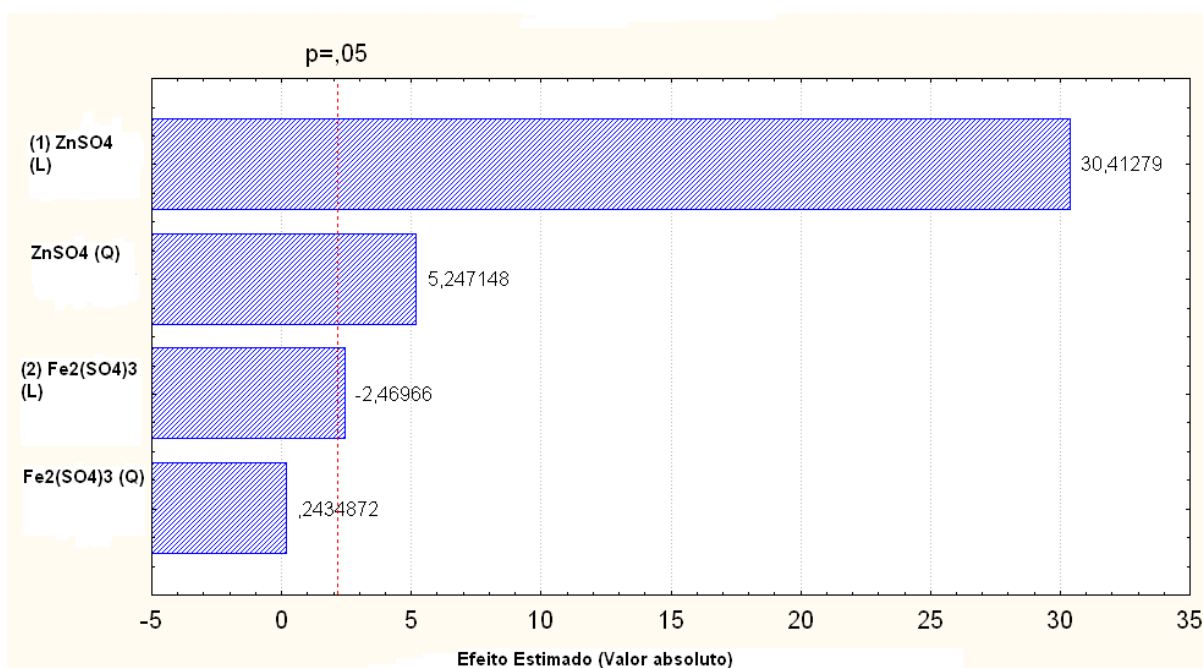
Na figura 34, tem-se o Diagrama de Pareto para as variáveis independentes estudadas. Ele apresenta a influência das variáveis independentes estudadas sobre a concentração de zinco acumulado na biomassa obtida, a um nível de significância de 95%.

O fator concentração de ZnSO_4 apresentou a tendência significativa ao aumento do acúmulo de zinco pela biomassa, que era a variável de resposta. Para os testes posteriores, foi estabelecido que esta concentração não seria aumentada além do limite máximo utilizado neste teste (10,0 g/L), por dois motivos: a cepa da levedura apresentou um padrão de acúmulo do metal presente no meio em torno de 10% pela sua biomassa, o que levaria a uma perda cada vez maior de zinco no sobrenadante em um suposto aumento progressivo do metal no meio; e a concentração de zinco orgânico obtida na biomassa produzida já se encontrava

semelhante à concentração de zinco orgânico presente em produtos vendidos no mercado para este fim.

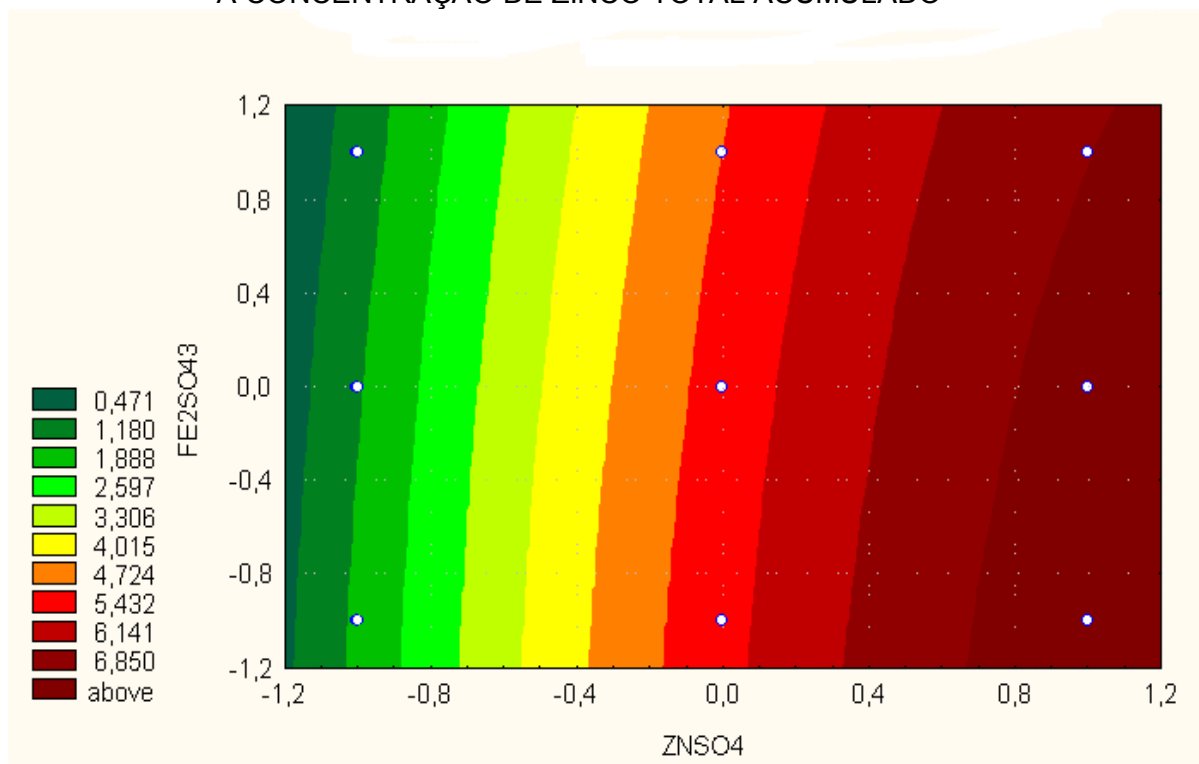
Já o fator da concentração de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ mostrou tendência significativa à diminuição do acúmulo de zinco pela biomassa. Entretanto, como este fator apresentou tendência ao aumento desta mesma variável de resposta no teste 4.5.3.1 na mesma concentração utilizada (0,1 g/L), pode-se concluir que a concentração de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ já se encontrava em sua faixa ideal de concentração. A adição de 0,1 g/L de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ foi utilizada na patente US 4.764.633, como uma ferramenta no auxílio da solubilização do sal de zinco (ANDERSON e ANDERSON, 1998).

FIGURA 34 – GRÁFICO DIAGRAMA DE PARETO: INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE ZINCO ACUMULADO



Na figura 35 é possível visualizar o gráfico de curva de contorno da variável de resposta concentração de zinco na biomassa em função dos fatores concentração de ZnSO_4 e concentração de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. As maiores concentrações de zinco na biomassa produzida ocorrem na concentração mais elevada (10 g/L) de ZnSO_4 , e na concentração mais baixa de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (0,1 g/L).

FIGURA 35 – GRÁFICO CONTORNO: INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES CONCENTRAÇÃO DE ZnSO_4 E CONCENTRAÇÃO DE $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE ZINCO TOTAL ACUMULADO



O melhor resultado obtido de concentração de zinco total acumulado na biomassa produzida por *P. guilliermondii* Wickerham NRRL 27063 foi de 75.090 mg/kg, sob as seguintes condições: ZnSO_4 , 10,0 g/L; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, 0,1 g/L. O aumento do acúmulo de zinco pela biomassa, quando comparado com o teste anterior de Planejamento Fatorial Fracionário (24.982 mg/kg) foi de cerca de 200%.

4.6 TESTES DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE ZINCO ORGÂNICO ADSORVIDO E ABSORVIDO

4.6.1 Rompimento Celular

Foram testados três métodos de rompimento celular: através de sonicação; através de adição de etanol, NaCl e pré-autolisado; e através de adição de álcali e aquecimento. A biomassa utilizada nos testes foi obtida de um cultivo celular em frasco Erlenmeyer sob as condições otimizadas no item 3.10.3.2.

Não foi observado o rompimento das células da *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 em microscópio óptico em nenhuma das condições de sonicação testadas em laboratório, nem utilizando-se o método descrito por SGARBIERI et al. (1999) e ALVIM et al. (2002), aplicando etanol, NaCl e pré-autolisado.

O único método que foi efetivo no rompimento das células desta levedura foi o utilizando álcali e aquecimento, observado em microscópio óptico como a formação de vários fragmentos de parede celular e ausência de células na suspensão.

4.6.2 Separação do Zinco Orgânico Adsorvido, Zinco Orgânico Absorvido e Zinco Livre

Após o rompimento celular, utilizando a técnica descrita no item 3.11.1.3, a suspensão foi centrifugada a 4000 rpm, por 10 minutos. O precipitado obtido era a fração Zinco Orgânico Adsorvido, e o sobrenadante continha as frações Zinco Orgânico Absorvido e Zinco Livre restante na biomassa. Para a separação destas duas frações, adicionou-se ao sobrenadante uma solução salina de NaCl a 10%, o que provocou a precipitação da proteínas ali presentes. A suspensão foi centrifugada a 4000 rpm, por 10 minutos. O precipitado resultante foi a fração Zinco Orgânico Absorvido, e o sobrenadante continha o Zinco livre presente na biomassa produzida.

Todas as frações de zinco identificadas foram quantificadas pelo método de determinação de zinco (item 3.14.1.3). Os resultados obtidos no teste de separação das diferentes variedades de zinco presentes na biomassa produzida estão dispostos na tabela 14.

TABELA 14 – QUANTIDADES DAS DIFERENTES VARIEDADES DE ZINCO PRESENTES NA BIOMASSA DE LEVEDURA RICA EM ZINCO ORGÂNICO AVALIADA

Tipo de Zinco	Quantidade de Zinco quantificada (mg/kg de peso seco de biomassa)
Zinco Total presente na biomassa	32.675,30
Precipitado resultante do rompimento celular (Zinco Orgânico Adsorvido)	22.422,50
Precipitado resultante da precipitação das proteínas do sobrenadante do rompimento celular (Zinco Orgânico Absorvido)	5.741,24
Zinco Livre (Diferença entre Zinco Total e demais variedades de zinco)	4.511,56

Este método estabelecido para a quantificação de cada uma das frações de zinco presentes na biomassa de levedura produzida é de grande importância, pois não foram encontrados na literatura estudos onde a fração de zinco orgânico adsorvido, de zinco orgânico absorvido e zinco livre fossem quantificados separadamente. O que existem são bibliografias que citam como quantificar o zinco total presente na biomassa, ou como identificar e quantificar os diferentes quelatos produzidos pela indústria através da síntese química (LEACH e PATTON, 1997).

4.7 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM ZINCO ORGÂNICO

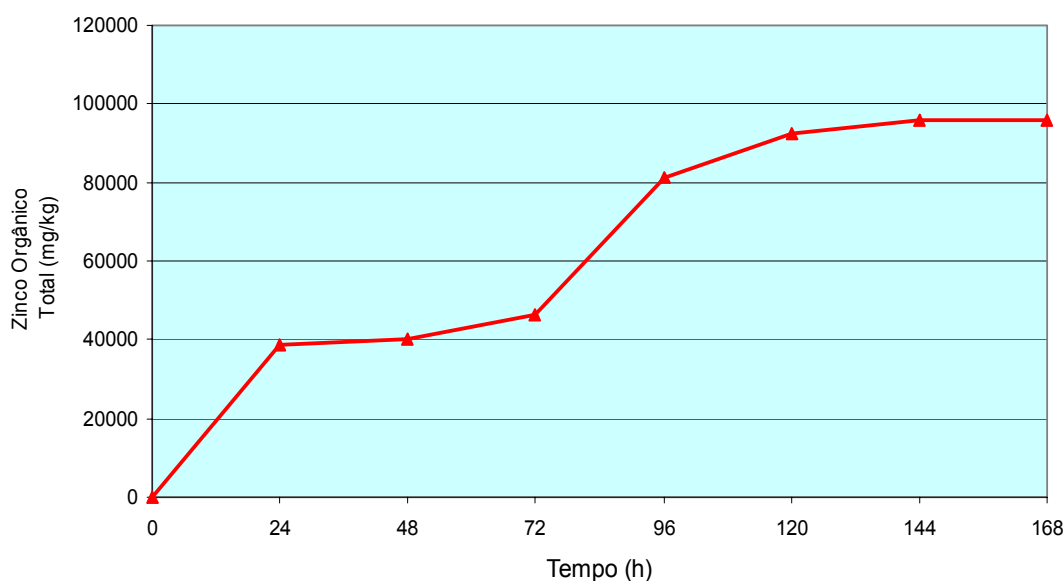
Após a obtenção das melhores condições físico-químicas do cultivo da levedura *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 em *Shaker*, avaliou-se a cinética de produção de biomassa enriquecida com zinco orgânico. Para isso, as melhores condições de concentração de ZnSO_4 , de MgSO_4 , de KH_2PO_4 , de Extrato de Levedura, de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$; de °Brix na forma de melaço de soja, de tempo de adição da solução de ZnSO_4 no fermentado, e de pH, para um maior acúmulo de zinco na biomassa, já tinham sido determinadas nos testes anteriores.

O cultivo das leveduras foi realizado em sistema de batelada e o volume de cultivo de 1,5 L. O fermentador utilizado foi um fermentador da marca Inceltech LH – SGI (set 2M), com 2 L de capacidade volumétrica.

Através do método de separação do zinco orgânico adsorvido, zinco orgânico absorvido e zinco livre, foi possível quantificar o zinco orgânico total presente na biomassa produzida.

Foi observado que o melhor tempo de obtenção de biomassa com alta concentração de zinco orgânico total foi de 144 horas, com uma concentração de zinco orgânico total de 96.030 mg/kg de biomassa produzida. Após este período, a concentração do zinco orgânico total na biomassa se manteve estável, como pode ser visualizado na figura 36.

FIGURA 36 – CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ZINCO ORGÂNICO TOTAL PELA CEPA *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y27063



O aumento na concentração de zinco total na biomassa obtida neste experimento, que foi de 102.890 mg/kg em 120 horas de cultivo, quando comparado com o resultado de concentração obtido em 120 horas no Planejamento Fatorial Completo 3², que foi de 75.090 mg/kg, pode ser justificado pela passagem dos testes em Erlenmeyer para Fermentador. A realização dos experimentos em Fermentador permite maior aeração e melhor agitação do meio de cultivo, facilitando assim a troca de gases.

O aumento do acúmulo de zinco pela biomassa, quando comparado o valor de zinco total obtido na cinética em 144 horas de cultivo (107.243 mg/kg) com o valor obtido no teste de seleção de cepas (6.820 mg/kg), foi de cerca de 1.472 %.

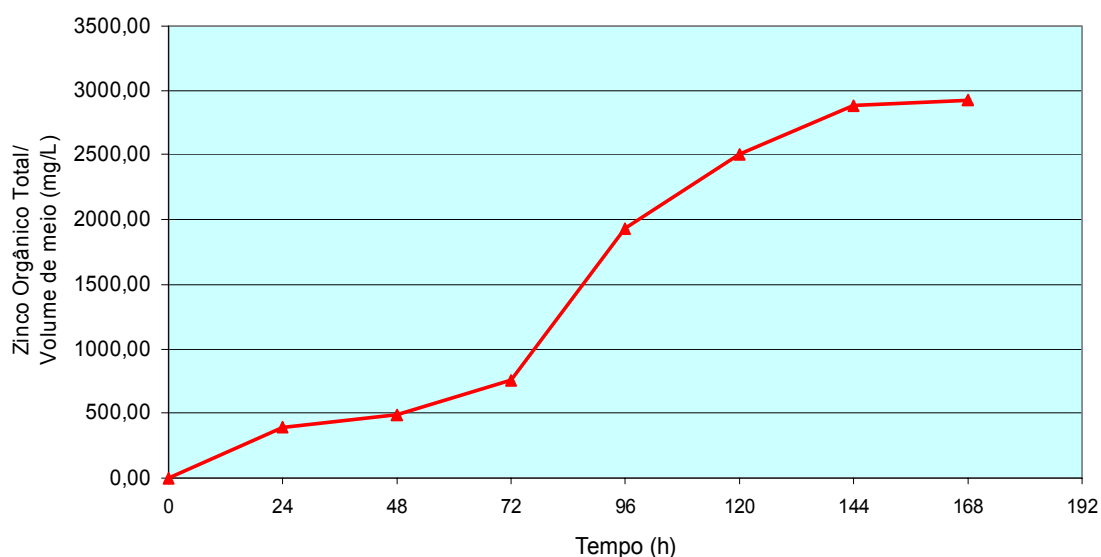
Os resultados obtidos estão em concentrações bem superiores às citadas pela literatura para o acúmulo de zinco total em bactérias (MATTUSCHKA e STRAUBE, 1993; MAMERIN et al., 1999), leveduras (AKAR e TUNALI, 2005;

KROGH et al., 1998; STEHLIK-THOMAS et al., 2004), plantas (DOYLE e OTTE, 1997; PRASANNA KUMAR et al., 2006) e fungos (GALUN et al., 1987; PURANIK e PAKNIKAR, 1997; IQBAL e EDYVEAN, 2004; BAIK et al., 2002), com exceção dos valores encontrados em testes com a planta *A. portulacoides* (DOYLE e OTTE, 1997) e com a cianobactéria *O. angustissima* (AHUJA et al., 1999) – 190.000 e 641.000 mg/kg, respectivamente. Entretanto, nenhum destes dois estudos utilizou a fermentação líquida como processo na produção desta biomassa, e em nenhum deles a quantidade de zinco orgânico total presente foi quantificada – somente a quantidade de zinco total.

É importante também lembrar que não foram encontrados relatos na literatura sobre a produção de biomassa de levedura enriquecida com zinco orgânico, utilizando a fermentação líquida – somente na produção de biomassa enriquecida com zinco total, e ainda com valores de concentrações obtidas bem abaixo das alcançadas nos estudos.

Com relação à quantidade de zinco orgânico total produzido por litro de fermentado, a maior concentração foi obtida no tempo de cultivo de 168 horas, que foi de 2.924 mg de zinco orgânico total/L de fermentado produzido (ver figura 37).

FIGURA 37 – CONCENTRAÇÃO DE ZINCO ORGÂNICO TOTAL EM RELAÇÃO AO VOLUME DE FERMENTADO PRODUZIDO EM FERMENTADOR

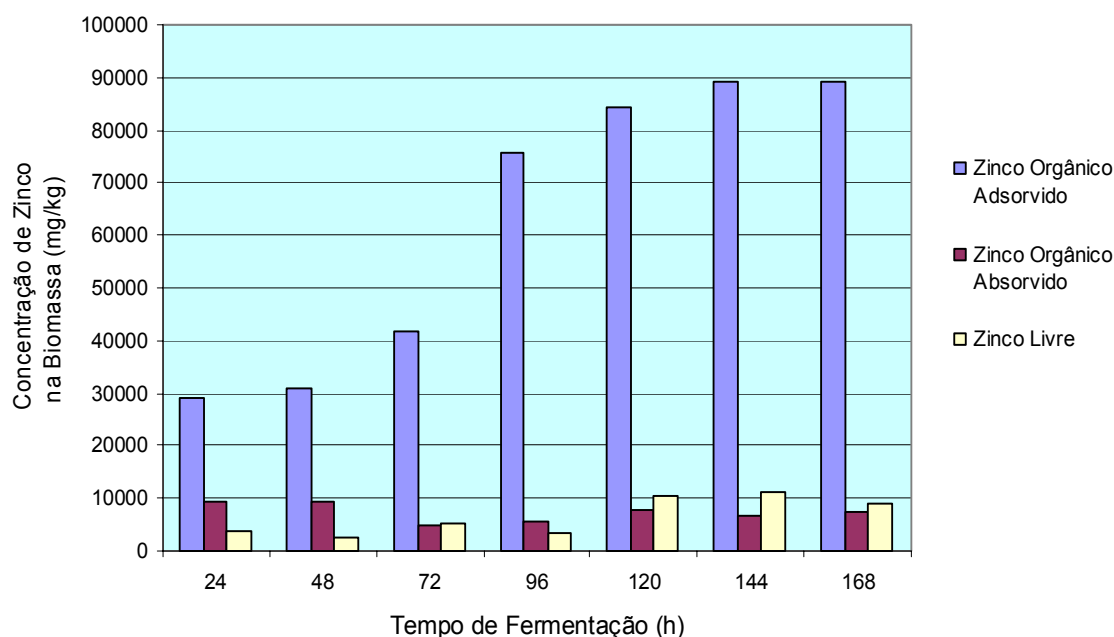


Os valores quantificados das diversas frações de zinco presentes na biomassa produzidas ao longo da cinética de produção da biomassa podem ser visualizados na figura 44. A quantidade de zinco orgânico adsorvido na biomassa encontra-se em maior quantidade em relação às outras variedades em todos os tempos analisados, sendo que sua maior concentração é no tempo de 144 horas de cultivo.

É possível observar que para o acúmulo do zinco pela cepa *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063, o processo de adsorção do metal, isto é, a porção de zinco que se liga na parede celular, é bem mais lento do que o comentado na literatura, além de ser contínuo. Também existe um aumento na concentração de zinco orgânico adsorvido após 72 horas de cultivo celular, fato este já observado no item 4.3.

O processo de absorção pode ser caracterizado neste cultivo celular como sendo contínuo, porém pouco significativo, quando observadas as quantidades das espécies de zinco presentes na biomassa identificadas ao longo do cultivo. Já o processo de biosorção, isto é, zinco orgânico adsorvido, mostrou-se dominante ao longo do cultivo, apresentando uma maior efetividade após 72 horas de cultivo celular.

FIGURA 38 – PORCENTAGEM DAS VARIEDADES DE ZINCO PRESENTES NA BIOMASSA PRODUZIDA NA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM ZINCO ORGÂNICO



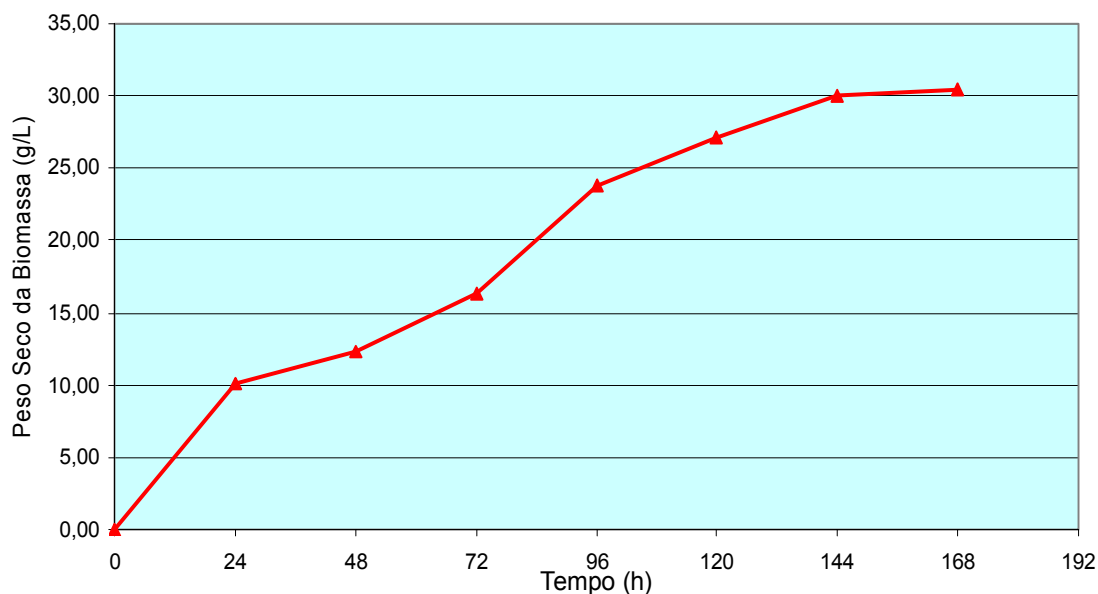
Não existem relatos na literatura onde as frações de zinco presente em uma biomassa enriquecida com zinco orgânico, produzida através de fermentação líquida, tenham sido separadas e quantificadas. Somente foram encontrados estudos onde o zinco total presente na biomassa foi quantificado.

A taxa de velocidade específica máxima de crescimento obtida no cultivo (μ máximo) foi de $0,0077 \text{ h}^{-1}$, enquanto que a produtividade máxima horária em biomassa (r_x máximo), isto é a velocidade máxima de produtividade de biomassa foi de $0,1511 \text{ g/L/h}$. A produtividade horária total da biomassa produzida (r total) foi de $0,1812 \text{ g/L/h}$.

A produtividade horária global (r global), levando-se em conta que o volume do fermentado era $1,5 \text{ L}$, foi de $0,2719 \text{ g/h}$. O tempo de duplicação (T_d) da biomassa no cultivo foi de 81 horas.

O peso seco da biomassa obtida ao longo do cultivo pode ser observado na figura 39. No tempo 144 horas, a produção atingiu o seu auge, com $30,00 \text{ g/L}$. O rendimento global do crescimento celular ($Y_{x/s}$) foi $1,1199 \text{ g}$ de biomassa produzida/g de substrato fornecido, ou ainda, $111,99\%$. A relação de C/N no meio de cultivo utilizado no cultivo foi de 4,03.

FIGURA 39 – PESO SECO DA BIOMASSA PRODUZIDA AO LONGO DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM ZINCO ORGÂNICO



A cepa *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 é uma ótima opção de microrganismo para a produção de biomassa de levedura enriquecida com zinco orgânico, para fins alimentares animais e humanos, utilizando a fermentação líquida.

4.8 TESTE PRODUÇÃO DE VITAMINA B₂

Neste estudo foi analisada a possibilidade de produção de vitamina B₂ extracelular pela cepa *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063.

A formulação do meio de cultivo utilizado foi idêntica à utilizada no item 3.12. Os testes foram realizados em condições semelhantes às utilizadas no teste de Planejamento Fatorial Completo 3². Foram realizados dois testes: um com presença de luz, outro com ausência de luz, protegendo-se o Erlenmeyer com papel laminado.

A produção de vitamina B₂ pela cepa estudada *P. guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063, em ausência de luz, foi de 1,3 µg/ mL, após 120 horas de crescimento celular. Já com a presença de luz durante o cultivo, a concentração desta vitamina no meio ao final do processo foi de 1,0 µg de vitamina B₂/ mL de meio de cultivo. Ao comparar-se estes valores com a literatura, verificou-se que as concentrações produzidas estão bem abaixo dos valores desejados.

PESSOA et al. (2003) produziram a vitamina B₂ utilizando um subproduto do refino de óleos vegetais, chamado de borra, e o microrganismo *Candida guilliermondii* DM 644. As condições empregadas foram: agitação orbital, ausência de luz, 30°C, e 24 h de incubação. A concentração máxima de riboflavina foi 19,12 µg/ mL, sendo o pH ideal encontrado de 5,0. Os fatores mais importantes para a produção de riboflavina foram a concentração de matéria graxa e a fonte de nitrogênio.

Segundo SABRY et al. (1989), o cultivo de *C. guilliermondii* Wickerham em meio de cultivo com a seguinte composição (g/L): (NH₄)₂SO₄, 5,25; NH₄H₂PO₄, 5,25; KH₂PO₄, 2,5; K₂HPO₄, 2,5; MgSO₄.7 H₂O, 0,1; e em pH inicial 6,0, a 30 °C por 14 dias em ausência de luz, produziu 120,6 µg/ mL de riboflavina, com a adição de arginina HCl ao meio de cultivo. A extração da vitamina B₂ ligada às células foi realizada através de aquecimento do fermentado após a fermentação por 30 minutos a 75 °C.

YAMANE et al. (1993) evidenciaram o efeito positivo do íon Zn²⁺ na produção de riboflavina por *Arthrobacter* na presença dos íons ⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺.

Com relação ao extrato de levedura, é conhecida sua ação no estímulo tanto do crescimento como flavinogênese (SABRY et al., 1991). Além disso, a presença de vitaminas do complexo presente no extrato poderia atuar como precursores da riboflavina ou mesmo como fator de crescimento para *P. guilliermondii* (PESSOA et al., 2003).

Estudos mais aprofundados necessitariam ser realizados para verificar se realmente esta cepa não é boa produtora de riboflavina, ou se existem variáveis no processo de cultivo que estão influenciando negativamente na sua produção.

5 CONCLUSÕES

O objetivo principal desta dissertação, de desenvolver um bioprocesso para a produção de biomassa de levedura com alto teor de zinco orgânico como alternativa de suplemento protéico para alimentação animal, foi atingido com sucesso.

As principais contribuições deste trabalho podem ser resumidas nos seguintes pontos:

- A cepa *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 foi selecionada devido ter atingido o maior acúmulo de zinco (6.820 mg/kg de biomassa, utilizando-se 0,5 g/L de ZnSO_4) e um valor de peso seco expressivo (9,83 g/L), dentre as cinco cepas estudadas .
- A cepa *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 demonstrou um acúmulo de zinco total de 7.997 mg/kg, após 120 horas de cultivo, tempo máximo de cultivo estudado.
- A cepa *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 não apresentou um aumento em resistência ao zinco quando submetida à técnica de semeadura. As células não adaptadas apresentaram maior concentração de células viáveis/mL de fermentado durante todo o cultivo celular, intensa presença de vacúolos em sua estrutura, e maior quantidade de zinco total acumulado em sua biomassa (10.848 mg/kg).
- Na otimização da fonte de carbono utilizando resíduos industriais, as melhores condições encontradas foram com 5° Brix de melaço de cana-de-açúcar e 5° Brix de melaço de soja, com acúmulo de 13.028 e 17.956 mg de zinco/kg de biomassa produzida, respectivamente.
- Na otimização da fonte de nitrogênio orgânico a ser adicionada ao meio de cultivo, a maior concentração de zinco total acumulado foi encontrada no teste com 5° Brix de melaço de soja e 10,0 g/L de extrato de levedura (10.128 mg/kg).

- No Planejamento Fatorial Fracionário 2^{8-4} , os fatores com tendência significativa ao aumento do acúmulo de zinco na biomassa foram a concentração de ZnSO_4 e concentração de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. A maior concentração de zinco total acumulado encontrada nos testes foi de 24.982 mg/kg.
- No Planejamento Fatorial Completo 3^2 , o fator concentração de ZnSO_4 apresentou tendência significativa ao aumento de acúmulo de zinco pela biomassa. A maior concentração de zinco total acumulado encontrado nos testes foi de 75.090 mg/kg.
- A melhor metodologia encontrada para o rompimento celular da *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 foi através da adição de álcali e aquecimento da suspensão de biomassa, que permitiu a separação e a quantificação das frações de zinco orgânico adsorvido, zinco orgânico absorvido e zinco livre, presentes na biomassa.
- A cinética de produção de biomassa de *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 rica em zinco orgânico demonstrou que a maior concentração de zinco orgânico total acumulado ocorreu em 144 horas, onde sua concentração foi de 96.030 mg/kg. Entre as frações de zinco presentes na biomassa, aquela em maior quantidade em todos os tempos de cultivo foi a de zinco orgânico adsorvido.
- Houve um incremento na concentração de zinco orgânico total quando se passou de frascos, cujo valor máximo atingido foi de 75.090 mg/kg, para o fermentador, que foi de 96.030 mg/kg. Isto pode ser justificado pela maior aeração e agitação do meio de cultivo no fermentador, facilitando assim a troca de gases.

- O percentual de aumento no acúmulo de zinco total pela biomassa, calculado a partir do valor obtido inicialmente no teste de seleção de cepas (6.820 mg/kg) e do valor atingido na cinética em 144 horas de cultivo (107.243 mg/kg), foi de 1.472 %.
- A concentração de zinco orgânico total encontrada em 144 horas de cultivo – 96.030 mg/kg, ou 9,6% - é semelhante a produtos presentes no mercado para suplementação mineral de zinco orgânico para animais. Além disso, esta concentração é muito maior que valores de concentração de zinco total acumulado por leveduras, fungos, bactérias e plantas, citados na literatura.
- A produção de vitamina B₂ pela *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 (1,3 µg/ mL com a ausência de luz, e de 1,0 µg/ mL com a presença de luz) foi abaixo de concentrações de produção desta vitamina citadas pela literatura para este microrganismo.
- A cepa *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 é uma ótima opção de microrganismo para a produção de biomassa de levedura enriquecida com zinco orgânico, para nutrição animal, através da fermentação líquida, utilizando resíduo industrial de melaço de soja.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

As seguintes sugestões para trabalhos futuros, perspectivas principalmente para a produção de biomassa de levedura enriquecida com zinco orgânico, deverão complementar a investigação iniciada com esta dissertação:

- Realizar o melhoramento genético da cepa *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063 através de tratamento com UV e testar nas condições otimizadas.
- Otimizar as condições físico-químicas restantes (manutenção do pH, aeração, agitação) em fermentador.
- Testar outras fontes de Nitrogênio Orgânico, provenientes de resíduos da agroindústria.
- Verificar o acúmulo do zinco em fermentações com culturas mistas de leveduras.
- Testar a adsorção do zinco pela biomassa morta de *Pichia guilliermondii* Wickerham NRRL Y 27063, com e sem tratamento com NaOH.
- Verificar a possibilidade de variáveis presentes no processo fermentativo influenciarem negativamente a produção de vitamina B₂ pela cepa estudada.
- Verificar qualitativamente os tipos de moléculas de zinco orgânico presentes na biomassa, através de cromatografia de camada fina e cromatografia líquida.
- Observar o acúmulo do zinco em leveduras imobilizadas em gel.

REFERÊNCIAS

- AAFCO. Association of American Feed Control Officials. **Official Publication**. Oxford, 2000.
- ACCIOLY, E.; SAUNDERS, C.; LACERDA, E. M. A. **Nutrição em Obstetrícia e Pediatria**. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2002.
- AGATE, A. D. Bioremediation and Biobeneficiation of metals. In: ROUSSOS, S. **New horizons in biotechnology**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 215-220.
- AHUJA, P.; GUPTA, R.; SAXENA, R. K. Zn^{2+} biosorption by *Oscillatoria angustissima*. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 77-85, 1999.
- AKAR, T.; TUNALI, S. Biosorption performance of *Botrytis cinerea* fungal by-products for removal of Cd(II) and Cu(II) ions from aqueous solutions. **Minerals Engineering**, v.18, n.11, p. 1099-1109, 2005.
- ALBION LABORATORIES. Is it a real chelate? **Albion Research Notes**, v. 9, n. 2, 2000.
- ALLEN, L. H. Zinc and micronutrient supplements for children. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 495-498, 1998.
- ALVIM, I. D.; SGARBIERI, V. C.; CHANG, Y. K. Desenvolvimento de farinhas mistas extrusadas à base de farinha de milho, derivados de levedura e caseína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 170 – 176, 2002.
- ANDERSON, M. D.; ANDERSON, D. R. **Ferric ion catalyzed complexation of zinc and/or manganese with alpha amino acids**. US Patent 4.764.633, 1998.

ANTONINI, S. R. C. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Depto. Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural, Centro de Ciências Agrárias, Campos Araras, 2004.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 33, de 13 de janeiro de 1998**. Adota valores como níveis de IDR para as vitaminas, minerais e proteínas. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 16 de janeiro de 1998. Disponível em <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=66> . Acesso em: fev. 2007.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. Ed. 16, Washington, 1997.

ASSIS, E. M. **Componentes da parede celular de leveduras**: proteínas e polissacarídeos de interesse das indústrias farmacêuticas e de alimentos. In: Workshop “Produção de biomassa de levedura: Utilização em alimentação humana e animal. Ital, Campinas, SP, 28 de agosto de 1996.

AVERY, S. V.; TOBIN, J. M. Mechanism of adsorption of hard and soft metal ions to *Saccharomyces cerevisiae* and influence of hard and soft anions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 2851-2856, 1993.

BAIK, W. Y.; BAE, J. H.; CHO, K. M.; HARTMEIER, W. Biosorption of heavy metals using whole mold mycelia and parts thereof. **Biosource Technology**, v. 81, p. 167-170, 2002.

BAPTISTA, A. S.; HORII, J.; BAPTISTA, A. S. Fatores físico-químicos e biológicos ligados à produção de micotoxinas. **Boletim CEPPA**, v. 22, n.1, p. 1-14, 2004.

BARUSELLI, M. S. **Suplementos e co-produtos na nutrição de gado de corte**. Trabalho apresentado no I SIMBOI – Simpósio sobre desafios e novas tecnologias na bovinocultura de corte, 02 a 03 de abril de 2005, Brasília-DF.

BEKATOROU, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A. A. Production of food grade yeasts. **Food Technology Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 407-415, 2006.

BELLAVER, L. H.; DE CARVALHO, N. M.; ABRAHAO-NETO, J.; GOMBERT, A. K. Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 7, p. 691-698, 2004.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. New York: WH Freeman and Company, 2002. p 270, 465, 687.

BOBBIO, F; BOBBIO, P. A. **Introdução à Química de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2003. p. 188-189.

BORZANI, W.; SCHMIDELL W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E (coord). **Biotechnologia Industrial: fundamentos**. V. 1. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 254 p.

BOUGLE, D.L.; SABATIER, J.P.; GUAYDIER-SOUQUIERES, G.; GUILLON-METZ, F.; LAROCHE, D.; JAUZAC, P. Zinc status and bone mineralization in adolescent girls. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 18, p. 17-21, 2004.

BOURGEOIS, C. M.; LARPENT, J. P. **Microbiologia Alimentar**. Volumen 2: Fermentaciones alimentarias. Zaragoza: Acribia, 1995, p. 19-29.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building**. Nova York: Wiley, 1978.

BRADY, D.; DUNCAN, J. R. Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 149-154, 1994.

BRANDAO-NETO, J.; SILVA, C. A. B.; REZENDE, A. A.; ALMEIDA, M. G.; SALES, V. S. P.; MARCHINI, J. U. S. Zinc pharmacokinetics in insulin-dependent diabetes mellitus patients after oral zinc tolerance test. **Nutrition Research**, v. 23, p. 141-150, 2003

BUTOLO, J. E. **Uso de Biomassa de levedura em alimentação animal:** propriedades, custo relativo a outras fontes de nutrientes. In: Workshop "Produção de biomassa de levedura: Utilização em alimentação humana e animal. Ital, Campinas, SP, 28 de agosto de 1996.

CABALLERO, R.; OLGUÍN, P.; CRUZ-GUERRERO, A.; GALLARDO, F.; GARCIA-GARIBAY, M.; GOMÉZ-RUIZ, L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* as baker's yeast. **Food Research International**, v. 28, n. 1, p. 37-41, 1995.

CEGLA, U. G.; SHUSTER, M. **Process for the production of soybean sugars and the product produced thereof.** US Patent 6.913.771, 2005.

CHAUHAN, A. K.; ARORA, D.; KHANNA, N. A novel feeding strategy for enhanced protein production by fed-batch fermentation in recombinant *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 139-145, 1999.

CHOI, M. H.; PARK, Y. H. Growth of *Pichia guilliermondii* A9, an osmotolerant yeast, in waste brine generated from kimchi production. **Biosource Technology**, v. 70, p. 231-236, 1999.

CORNELIS, R.; CREWS, H.; DONARD, O.; EDBON, L.; PITTS, L.; QUEVAUVILLER, J. Summary paper of the EC Network on trace element speciation for analysts, industry and regulators - what we have and what we need. **Journal of Environmental Monitoring**, v.3, p. 97-101, 2001.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotechnology**. 2. ed. Sunderland: Sinauer, 1989. p. 222-223, 225.

DE OLIVEIRA, C. G. R. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) rica em organoselênio. Dissertação de mestrado. Curso de pós-graduação em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006. 65 p.

DE SOUZA, A. C. S.; FERREIRA, C. V.; JUCÁ, M. B.; AOYAMA, H. Riboflavina: uma vitamina multifuncional. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 887-891, 2005.

DEMAIN, A. L.; DAVIES, J. E. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 2.ed. AMS Press: Washington, 1999. 830 p.

DEMIRCI, A.; POMETTO III, A. L. Enhanced Organically Bound Chromium Yeast Production. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 531-536, 2000.

DEVERGILIS, C.; MURGIA, C.; DANSCHER, G.; PEROZZI, G. Exchangeable zinc ions transiently accumulate in a vesicular compartment in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 323, p. 58-64, 2004.

DOBRANSKI, Z.; JAMROZ, D.; GÓRECKA, H.; OPALINSKI, S. Bioavailability of selenium and zinc supplied to the feed for laying hens in organic and inorganic form. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v. 6, n. 2, 2003.

DONMEZ, G.; AKSU, Z. Bioaccumulation of cooper (II) and nickel (II) by the non-adapted and adapted growing *Candida* spp. **Water Research**, v.35, n. 6, p. 1425-1434, 2001.

DONMEZ, G.; AKSU, Z. The effect of cooper (II) ions on the growth and bioaccumulation properties of some yeasts. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 135-142, 1999.

DOYLE, M. O.; OTTE, M. L. Organism-induced accumulation of iron, zinc and arsenic in wetland soils. **Environmental Pollution**, v. 96, p. 1-11, 1997.

DROBY, S.; HOFSTEIN, R.; WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M.; FRIDLENDER, B.; COHEN, L.; WEISS, B.; DAUS, A.; TIMAR, D.; CHALUTZ, E. Pilot testing of *Pichia guilliermondii*: a biological agent of postharvest diseases of citrus fruit. **Biological Control**, v. 3, p. 47-52, 1993.

DUTRA-DE-OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S. **Ciências Nutricionais**. Editora Savier: São Paulo, 1998.

ECKER, D.J.; BUTT, T.R.; STERNBERG, E.J.; NEEPER, M.P.; DEBOUCK, C.; GORMAN, J.A.; CROOKE, S. T. Yeast metallothionein functional in metal ion detoxification. **The Journal of Biological Chemistry**, v.261, n.36, p.16.895-16.900, 1986.

EIDE, D. Molecular biology of iron and zinc uptake in eukaryotes. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, p. 573-577, 1997.

ENGL, A.; KUNZ, B. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: effects of nutrient conditions. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 63, p. 257-261, 1995.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 1. ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. 510 p.

FAO/WHO/UNU. **Energy and protein requirements**. Relatório da Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. No. série 724, FAO/WHO e United Nations University, Geneva, 1985.

FERREIRA, E. M. F. C. **Identificação e controle adaptativo de processos biotecnológicos**. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia. Universidade do Porto. Porto, 1995. 299 p.

FISBERG, M.; BRAGA, J. A. P. Oligoelementos. In: NÓBREGA, F. J. **Distúrbios da Nutrição**. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. p. 353-357.

FUNPECRP. **Structures of the galactosidases raffinose and stachyose and the enzymes that catalyze their hydrolysis.** Disponível em: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2004/vol3-3/images/gmr0099fig5.jpg>. Acesso em: fev. 2007.

GADD, G. M. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. **Experientia**, v. 46, n. 8, p. 834-840, 1990.

GADD, G. M.; MOWLL, J. L. The relationship between cadmium uptake, potassium release and viability in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 16, p. 45 – 48, 1983.

GALUN, M; GALUN, E.; SIEGEL, B.Z.; KELLER, P.; LEHR, H.; SIEGEL, S. M. Removal of metal ions from aqueous solutions by *Pencillium* biomass: Kinetic and uptake parameters. **Water, Air and Soil Pollution**, v.33, p. 359-371, 1987.

GAUDREAU, H.; CONWAY, J.; CHAMPAGNE, C.P. Production of zinc-enriched extract. **Journal of Food Science and Technology**, v. 38, n. 4, p. 348-351, 2001.

GIBSON, R.S.; FERGUSON, E. L. Assessment of dietary zinc in a population. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 430-434, 1998.

GITAN, R. S.; LUO, H.; RODGERS, J.; BRODERIUS, M.; EIDE, D. Zinc-induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 44, p. 28.617 - 28.624, 1998.

GLAZER. A. N., NIKAIDO, H. **Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology**. New York: W. H. Freeman and Company, 1998. p. 79 -81

GUERINOT, M. L.; EIDE, D. Zeroing in on zinc uptake in yeast and plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 244-249, 1999.

GUO, R.; HENRY, P. R.; HOLWERDA, R. A.; CAO, J. LITELL, R. C.; MILES, R. D.; AMMERMAN, C. B. Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic copper sources for poultry. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 1132-1141, 2001.

HAEGENS, N. **Structures of the sucrose, glucose and fructose**. Disponível em: <http://www.classofoods.com/fotos/sucrose%2003.jpg>. Acesso em: fev. 2007.

HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**. Boca Raton: CRC Press, 1991. 312 p.

HEGOCZKI, J.; SUHAJDA, A.; JANZSO, B.; VERECZKEY, G. Preparation of chromium enriched yeast. **Acta Alimentaria**, v. 26, n. 4, p. 345-358, 1997.

HENGEL LTDA. **Melaços**. Disponível em: <http://www.hengel.com.br/portugues/melaco.html>. Acesso em: jun. 2007.

HENLEY, E.C.; KUSTER, J.M. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino acid scoring. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 4, p. 74-77, 1994.

HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: **Biotecnologia Industrial**. V. 2. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 93 p.

HUGHES, M. N.; POOLE, R. K. Metal speciation and microbial growth – the hard (and soft) facts. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 725-734, 1991.

ICIDCA. Instituto Cubano de Pesquisa dos Derivados da Cana-de-açúcar. **Manual dos derivados da cana-de-açúcar**: diversificação, matérias-primas, derivados do

bagaço, derivados do melaço, outros derivados, resíduos, energia. Brasília: ABIPTI, 1999. p. 49-55, 267-271, 297-301.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. 3. ed. v.1. São Paulo, 1985. 533 p.

IQBAL, M.; EDYVEAN, R. G. J. Biosorption of lead, copper and zinc in a loofa sponge immobilised biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. **Mineral Engineering**, v. 17, p. 217-223, 2004.

KELLER, K. A.; CHU, Y.; GRIDER, A.; COFFIELD, J. A. Supplementation with L-histidine during dietary zinc repletion improves short-term memory in zinc-restricted young adult male rats. **Journal of Nutrition**, v.130, p. 1633-1640, 2000.

KELLER, P. T.; QUANG, L. V.; BACHER, A.; KOZLOWSKI, J. E.; FLOSS, H. G. Biosynthesis of riboflavin analysis of biosynthetically carbon 13-labelled riboflavin by double-quantum and two dimensional NMR. **Journal of the American Chemists Society**, v. 105, p. 2505 - 2509, 1983.

KESSLER, J.; MOREL, I.; DUFEY, P.A.; GUTZWILLER, A.; STERN, A.; GEYER, H. Effect of organic zinc sources on performance, zinc status and carcass meat and claw quality in fattening bulls. **Livestock Production Sciences**, v. 81, p. 161 – 171, 2003.

KHALED, S.; BRUN, J. F.; BARDET, L.; CASSANAS, G. Importance physiologique du zinc dans l'activité physique. **Science & Sports**, v. 12, p.179-191, 1997.

KOEHLER, H. S. **Estatística experimental**. Curitiba: UFPR, 1999. 124 p.

KRATOCHVIL, D.; VOLESKY, B. Advances in the biosorption of heavy metals. **Tibtech**, v. 16, p. 291- 300, 1998.

KRAUTER, P.; MARTINELLI, R.; WILLIAMS K.; MARTINS, S. Removal of Cr(VI) from ground water by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biodegradation**, v. 7, p. 277-286, 1996.

KROGH, N.; OLSEN, J.; JENSEN, B.; REESLEV, M. Uptake of Zn^{2+} by yeast and mycelial growth form of *Aureobasidium pullulans* grown in chemostat culture. **FEMS Microbiology Letters**, v. 163, p. 249-253, 1998.

KSHEMINSKA, H.; FEDOROVYCH, D.; BABYAK, L.; YANOVYCH, D.; KASZYCKI, P.; KOLOCZEK, H. Chromium (III) and (IV) tolerance and bioaccumulation in yeast: a survey of cellular chromium content in selected strains of representative genera. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1565-1572, 2005.

KURZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts**: a taxonomic study. 4. ed. New York: Elsevier, 1998. 1074 p.

LEACH, G. A.; PATTON, R. S. Analysis techniques for chelated minerals evaluated. **Feedstuffs**, v. 69, n. 13, p. 13-15, 1997.

LEIMER, K. H. **Aproveitamento de Derivados de Levedura em alimentação Humana e Animal**. Trabalho apresentado no Fórum de agronegócios: cana-de-açúcar aplicações em biotecnologia. Campinas, 25 de agosto de 2005.

LETHI, K. K. Iron, folic acid and zinc intakes and status of low socio-economic pregnant and lactating amazonian women. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 43, p. 505-513, 1989.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E; BORZANI, W.; SCHMIDELL W. (coord). **Biotecnologia Industrial**: Processos fermentativos e enzimáticos. V. 3. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 593 p.

LITCHFIELD, J. H. Production of single-cell protein for use in food or feed, in: PEPPLER, H. J.; PERLMAN, D. **Microbial Technology**. V. 1. New York: Academic Press, 1979. p. 93.

LIU, X. F.; SUPEK, F.; NELSON, N.; CULOTTA, V. C. Negative Control of Heavy Metal Uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 Gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 18, p. 11763-11769, 1997.

MACDIARMID, C. W.; GAITHER, L. A.; EIDE, D. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO Journal**, v. 19, p. 2845–2855, 2000. Disponível em: http://www.nature.com/emboj/journal/v19/n12/fig_tab/7593108f9.html. Acesso em: fev. 2007.

MALIK, A. Metal bioremediation through growing cells. **Environmental International**, v. 30, p. 261-278, 2004.

MAMERIN, N.; BOUDRIES, N.; ADDOUR, L.; BELHOCINE, D.; LOUNICI, H.; GRIB, H.; PAUSS, A. Batch zinc biosorption by a bacterial non-living *Streptomyces risomus* biomass. **Water Research**, v. 33, n. 6, p. 1347-1354, 1999.

MATSUTANI, K.; FUKUDA, Y.; MURATA, K.; KIMURA, A.; YAJIMA N. Adaptation mechanism of yeast to extreme environments: construction of salt-tolerance mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 73, n. 3, p. 228-229, 1992.

MATTUSCHKA, B.; STRAUBE, G. Biosorption of metals by a waste biomass. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 58, p. 57-63, 1993.

MCDOWELL, L. R. **Minerals in animal and human nutrition**. New York: Academic Press, 1992. p. 265-292, 368.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Secretaria de apoio rural e cooperativismo. **Portaria SARC Nº 384, de 26 de dezembro de 2003.** Aprova o Regulamento Técnico sobre Avaliação da Segurança de Uso, Registro e Comercialização de Aditivos para Alimentação Animal. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 13 de agosto de 2004. Disponível em <http://www.bsmi.gov.tw/upload/b0d/TBTENQ/Member/Brazil/BRA-148-Relevant.htm>. Acesso em: fev. 2007.

MOTTA, V. T.; WAGNER, M. B. **Bioestatística**. 1. ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2001. 201 p.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375 – 380, 1944.

NETO, B. de B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2003. 402 p.

OLCZYK, C. N-alkanes as a substratum for riboflavin production: investigations of dynamics of the flavinogenesis in chosen yeasts of the genus *Candida*. **Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy**, v. 30, p. 83-88, 1978.

OSMAN, H. G.; SHAHEEN, F. A. Studies on the biosynthesis of riboflavin by *Ashbya gossypii*. **The 1st Arab Chemical Congress**, Cairo, 13 de abril de 1966.

PACHECO, M. T. B. **Levedura como fonte de proteína: Extração, Isolamento, Propriedades nutritivas e funcionais**. In: Workshop “Produção de biomassa de levedura: Utilização em alimentação humana e animal. Ital, Campinas, SP, 28 de agosto de 1996(a).

PACHECO, M. T.B. **Propriedades funcionais, nutricionais e toxicológicas de concentrados proteicos de levedura (*Saccharomyces* sp), obtidos por**

diferentes processos de extração. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP. 1996(b), 158p.

PARIPATANANONT, T.; LOVELL, R. L. Chelated zinc reduces the dietary zinc requirement of channelfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 133, p. 73-82, 1995.

PARKS, F. P.; HARMSTON, K. J. Judging organic trace minerals. **Feed Management**, v. 45, n. 10, p. 35-38, 1994.

PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos.** Barueri: Manole, 2005. 444 p.

PESSOA, M. L. A.; ANDRADE, S. A. C.; SALGUEIRO, A. A.; STAMFORD, T. L. M. Aproveitamento de subproduto industrial de óleos vegetais para produção de riboflavina por *Candida guilliermondii* DM 644. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 453-458, 2003.

PIERCE, J. S. Analysis committee measurement of yeast viability. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 76, n.5, p. 442-443, 1970.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Air pressure effects on biomass yield of two different *Kluyveromyces* strains. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 756-762, 2000.

PONCE DE LEÓN, C.A; BAYÓN, M. M.; PAQUIN, C.; CARUSO, J. A. Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 602-610, 2002.

PRASANNA KUMAR, Y.; KING, P.; PRASAD, V. S. R. K. Zinc biosorption on *Tectona grandis* L. f. Leaves biomass: Equilibrium and kinetic studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 124, n. 1-3, p. 63-70, 2006.

PURANIK, P. R.; PAKNIKAR, K. M. Biosorption of lead and zinc from solutions using *Streptoverticillum cinnamoneum* waste biomass. **Journal of Biotechnology**, v. 55, p. 113-124, 1997.

RADISKY, D.; KAPLAN, J. Regulation of transition metal transport across the yeast plasma membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n.8, p. 4481-4484, 1999.

RAGAB, A. M. E. **Biosynthesis of riboflavin and its derivatives by *Eremothecium ashybii***. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências. Ain Shams University, 1968. 126 p.

RATLEDGE, C.; KRISTIANSEN, B. **Basic Biotechnology**. 2. ed. Cambridge University Press: United Kingdom, 2002. 568 p.

SABRY, S. A.; EL-REFAI, A. H.; GAMATI, S. Y. Physiological study on riboflavin production by a hydrocarbon utilizing culture of *Candida guilliermondii* Wickerham. **Journal of Islamic Academy of Sciences**, v. 2, n.1, p. 27-30, 1989.

SABRY, S. A.; EL-SAYED, M.; GAMATI, S. Y.; EL-REFAI, A. H. Hydrocarbon utilization by *candida guilliermondii*. **Biomedical Letters**, v. 46, p. 615-618, 1991.

SALGUEIRO, M. J.; ZUBILLAGA, M. B.; LYSIONEK, A. E.; CARO, R. A., WEILL, R.; BOCCIO, J. R. The role of zinc in the growth and development of children. **Nutrition**, v. 18, p. 510-519, 2002.

SALIGKARIAS, I. D.; GRAVANIS, F. T.; EPTON, H. A. S. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: I. in vivo studies. **Biological Control**, v. 25, p. 143-150, 2002.

SANTUCCI, M. C. C.; ALVIM, I. D.; SCHMIT, F.; FARIA, E. V.; SGARBIERI, V. C. Enriquecimento de macarrão com derivados de levedura (*Saccharomyces* sp.):

impacto nutricional e sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 290 – 295, 2003.

SCHOHN, A. J. **Yeast: Brings it all together!** Disponível em: <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/beer/yeast/yeast2.htm>. Acesso em: fev. 2007.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. 1. ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. 433p.

SGARBIERI, V. C.; ALVIM, I. D.; VILELA, E. S.; BALDINI, V. L.; BRAGAGNOLO, N. Produção Piloto de Derivados de Levedura (*Saccharomyces* sp.) para uso como ingrediente na formulação de alimentos). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, n. 1 e 2, p. 119-125, 1999.

SHAY, L. K.; HUNT, H. R.; WEGNER, G. H. High productivity fermentation process for cultivating industrial microorganisms. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 2. p. 79-85, 1987.

SHOEIB, T.; MESTER, Z. Towards the characterization of metal binding proteins in metal enriched yeast. **Microchemical Journal**, v.85, n. 2, p. 329-340, 2007.

SIGMA ALDRICH. **Enzymatic Cell Lysis and Protoplast Preparation**: Enzymes for Yeast Cells. Disponível em: http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Key_Resources/Lysing_Enzymes.html. Acesso em: fev. 2007.

SOMOGYI, M. A new reagent for determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, 160, p. 61 – 68, 1945.

SPEARS, J. W.; KEGLEY, E. B. Effect of zinc source (zinc oxide vs. zinc proteinate) and level on performance, carcass characteristics, and immune response of growing and finishing steers. **Journal of Animal Sciences**, v. 80, p. 2747 – 2752, 2002.

SPEARS, J. W.; KEGLEY, E. B.; WARD, J. D. Bioavailability of organic, inorganic trace minerals explored. **Feedstuffs**, v. 27, p. 12-20, 1991.

SPEARS, J. W. Organic trace mineral in ruminant nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 58, p.151-163, 1996.

SPEARS, J. W. Zinc methionine for ruminant: relative bioavailability of zinc in lambs and effects on growth and performance of growing heifers. **Journal of Animal Science**, v. 67, p. 835-843, 1989.

STEHLIK-TOMAS, V.; GRBA, S.; RUNJIC-PERIC, V. Zinc uptake by *Saccharomyces cerevisiae* and its impact on alcohol fermentation. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v.11, p. 147-151, 1997.

STEHLIK-TOMAS, V.; ZETIC, V. G.; STANZER, D.; GRBA, S.; VAHCIC, N.. Zinc, cooper and manganese enrichment in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Technology Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 115-120, 2004.

STOLL, A.; DUNCAN, J. R. Enhanced heavy metal removal from waste water by viable, glucose pretreated *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 10, p. 1209-1212, 1996.

SUHAJDA, A.; HEGOCZKI, J.; JANZSO, B.; PAIS, I.; VERECZKEY, G. Preparation of selenium yeasts I. Preparation of selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 14, p. 43-47, 2000.

TEMPLETON, D. M.; ARIESE, F.; CORNELIS, R.; DANIELSON, L. G.; MUNTAU, H.; VAN LEEUWEN, H. P.; LOBINSKI, R. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements: definitions, structural aspects, and methodological approaches. **Pure Applied Chemistry**, v. 72, n. 8, p. 1453-1470, 2000.

UFSC. Grupo de Processos Biotecnológicos. **Leveduras**. Disponível em: http://www.eng.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_grad2004/microorganismos/leveduras.htm. Acesso em: jun. 2007.

UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO. **Agroindústria da cana-de-açúcar: alta competitividade canavieira**. Disponível em: http://www.unica.com.br/pages/agroindustria_alta.asp. Acesso em: fev. 2007.

UNITED STATES SUGAR CORPORATION. **Molasses composition**. Disponível em: <http://www.suga-lik.com/molasses/composition.html>. Acesso em jun. 2007.

USHIDA, K.; MANDEBVU, P.; BALLARD, C. S.; SNIFFEN, C. J.; CARTER, M. P. Effect of feeding a combination of zinc, manganese and copper amino acid complexes, and cobalt glucoheptonate on performance of early lactation high producing dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 93, p. 193-203, 2001.

VILELA, E. S. D.; SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I. D. Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces* sp). **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 13, n. 3, p. 185 – 192, 2000.

VINSON, J. A.; HSIAO, H. Comparison Effect of Various Forms of Chromium on Serum Glucose: An In Vivo Assay for Biologically Active Chromium. **Nutritional reports International**, v. 32, n.1, p. 56-61, 1985.

VOLESKY, B. **Biosorption of heavy metals**. CRC Press: Boca Raton, 1990. p. 139-171.

VOLESKY, B.; HOLAN, Z. R. Biosorption of heavy metals. **Biotechnology Progress**, v. 11, p. 235-250, 1995.

VOLESKY, B.; MAY-PHILLIPS, H. A. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 42, p. 797-806, 1995.

WELCH, R. M. Distribution and transport of zinc in plants. In: ROBSON, A. D. (ed), **Zinc and soil and plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p.183-195.

WHEALS, A. **Scanning electron micrograph of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae***. Disponível em: <http://www.bath.ac.uk/bio-sci/wheals2.htm>. Acesso em: fev. 2007.

WIKIPEDIA. **Bild : Neubauer improved counting chamber**. Disponível em: http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Neubauer_improved_counting_chamber.jpg. Acesso em: fev. 2007a.

WIKIPEDIA. **Riboflavina**. Disponível em: <http://it.wikipedia.org/wiki/Riboflavina>. Acesso em: fev. 2007b.

YAMANE, Y.; OOSHIMA, H.; KATO, J. Over-production of riboflavin by an *Arthrobacter* sp. mutant resistant to 5-fluorouracil. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 15, p. 877 – 880, 1993.

YAZGAN, A.; OZCENGİZ, G. Subcellular distribution of accumulated heavy metals in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 8, p. 871-874, 1994.

YOSHIKAWA, Y.; UEDA, E.; KOJIMA, Y.; SAKURAI, H. The action mechanism of zinc(II) complexes with insulinomimetic activity in rat adipocytes. **Life Sciences**, v. 75, p. 741-751, 2004.

APÊNDICE

APÊNDICE A - MATRIZES DOS PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS

PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2⁸⁻⁴

	Replicata	ZnSO ₄	MgSO ₄	KH ₂ PO ₄	Extrato de Levedura	°Brix	Fe ₂ (SO ₄) ₃	Tempo de adição solução ZnSO ₄	pH
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
3	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
4	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1
7	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1
8	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1
9	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1
10	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1
11	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1
12	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1
13	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1
14	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1
15	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
16	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
17	2	1	1	1	1	1	1	1	1
18	2	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
19	2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
20	2	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1
21	2	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
22	2	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1
23	2	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1
24	2	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1
25	2	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1
26	2	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1
27	2	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1
28	2	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1
29	2	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1
30	2	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1
31	2	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
32	2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 3²

	Replicata	ZnSO ₄	Fe ₂ (SO ₄) ₃
1	1	-1	-1
2	1	-1	0
3	1	-1	1
4	1	0	-1
5	1	0	0
6	1	0	1
7	1	1	-1
8	1	1	0
9	1	1	1
10	2	-1	-1
11	2	-1	0
12	2	-1	1
13	2	0	-1
14	2	0	0
15	2	0	1
16	2	1	-1
17	2	1	0
18	2	1	1